



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

Sistema de Estudios de Posgrado

Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología

Especialidad de Inmunología Clínica

**Diagnóstico molecular como herramienta diagnóstica,
pronóstica y de abordaje terapéutico temprano, en pacientes
pediátricos con inmunodeficiencias primarias en Costa Rica.**

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Especialidad

Elexandra Lucía Barboza Arguedas

2021



**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

ACTA-54-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el jueves 24 de junio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **Elexandra Lucía Barboza Arguedas** carné # **B20793**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Inmunología Clínica**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Alexandra Rucavado Romero, PhD., quien preside y lectora, Laura Barzuna Venegas, MSc. lectora y Carlos Santamaría Quesada, PhD., tutor.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **“Diagnóstico molecular como herramienta diagnóstica, pronóstica y de abordaje terapéutico temprano, en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias en Costa Rica”**

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado Reprobado

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 6:04 pm horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
Alexandra Rucavado Romero, PhD. Quien preside	_____	1-0717-0357
Carlos Santamaría Quesada, PhD.	_____	1-0992-0493
Laura Barzuna Venegas, MSc.	_____	1-0777-0951
Elexandra Lucía Barboza Arguedas Estudiante	_____	1-1532-0778

Observaciones: Se sugiere darle a la estudiante mención de honor por su excelente desempeño

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

Tabla de contenidos

CAPITULO 1.....	9
1.1 Antecedentes.....	10
1.1.1 Historia de las inmunodeficiencias primarias.....	10
1.1.2 Epidemiología.....	12
1.2 Marco referencial.....	14
1.2.1 Definición de las Inmunodeficiencias primarias.....	14
1.2.2 Clasificación general.....	16
1.2.3 Diagnóstico general de las inmunodeficiencias primarias.....	18
1.2.4 Manejo general de inmunodeficiencias primarias.....	23
CAPÍTULO 2.....	24
2.1 Justificación.....	25
2.2 Problema de investigación.....	27
2.3 Objetivo General.....	27
2.4 Objetivos Específicos.....	27
CAPITULO 3.....	28
3.1 Metodología.....	29
CAPITULO 4.....	31
4.1 Secuenciación de Sanger.....	32
4.2 MLPA.....	33
4.3 Secuenciación de Nueva Generación.....	34
4.4 Clasificación de variantes.....	41
CAPÍTULO 5.....	42
5.1 Inmunodeficiencia Combinada Severa.....	43
5.2 Inmunodeficiencias humorales.....	50
5.2.1 Agammaglobulinemia.....	51
5.2.2 Defectos de recombinación por cambio de clase (Síndrome Hiper IgM).....	55
5.4 Ataxia Telangiectasia.....	63
CAPÍTULO 6.....	66
6.1 Estrategias terapéuticas disponibles en inmunodeficiencias primarias.....	67
6.2 Otras alternativas terapéuticas según el diagnóstico genético.....	70
6.3 Implicaciones pronósticas del diagnóstico genético.....	73
CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Elexandra Lucía Barboza Arguedas, con cédula de identidad 1-1532-0778, en micondición de autor del TFG titulado:

“Diagnóstico molecular como herramienta diagnóstica, pronóstica y de abordaje terapéutico temprano, en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias en Costa Rica”

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Elexandra Lucía Barboza Arguedas .

Número de Carné: B20793 Número de cédula: 1-1532-0778 .

Correo Electrónico: elex_93@gmail.com .

Fecha: 10 de julio, 2021 . Número de teléfono: _____ .

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Carlos Santamaría Quesada .

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas inmunológicas básicas utilizadas para el diagnóstico de IDP	18
Tabla 2. Comparación entre métodos moleculares utilizados para el diagnóstico de IDP	39
Tabla 3. Herramientas disponibles para la clasificación de variantes genéticas.....	41
Tabla 4. Genes asociados a la inmunodeficiencia severa combinada.....	46
Tabla 5. Genes asociados a la agammaglobulinemia.....	52
Tabla 6. Genes asociados a los defectos de recombinación por cambio de clase de inmunoglobulina.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Total de casos registrados por país pertenecientes a LASID (LASID, 2020).....	13
Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología.....	30
Figura 3. Estructura del gen IL2RG y puntos calientes mutacionales descritos.....	47
Figura 4. Estructura del gen ADA y puntos calientes mutacionales descritos.....	49
Figura 5. Estructura del gen AK2 y variantes patogénicas.....	50
Figura 6. Estructura del gen y dominios de BTK y sitios calientes mutacionales descritos	54
Figura 7. Estructura del gen CD40LG y sitios calientes mutacionales descritos.....	58
Figura 8. Estructura del gen CD40 y variantes patogénicas descritas.....	60
Figura 9. Estructura del gen, dominios y variantes patogénicas descritas de AICDA	61
Figura 10. Estructura del gen y dominios de PIK3CD y variantes patogénicas descritas.....	63
Figura 11. Estructura del gen ATM y variantes patogénicas más frecuentes de Costa Rica	65
Figura 12. Opciones terapéuticas disponibles para las inmunodeficiencias descritas en el capítulo 2.....	72

Abreviaturas

ACMG: Colegio Americano de Genética Médica

ADA: AdenosinDeaminasa

ADN: Ácido desoxirribonucleíco

AID: Citidinadeaminasa activada inducida

ALPS: Síndrome Linfoproliferativo Autoimune

AT: Ataxia Telangiectasia

ATM: Ataxia telangiectasia mutado

BAFF-R: Receptor del activador de células B

BCR: Receptor de célula B

BLNK: Proteína enlazadora de células B

BTK: Bruton tirosin quinasa

CARD11: Proteína 11 con dominio de reclutamiento de caspasa

CD40LG: gen C40 ligando

CD40L: Ligando de CD40

CMV: Citomegalovirus

CNV: Variación de Número de Copia

CRAT-A: Costa Rica ataxia telangiectasia A

CRAT-B: Costa Rica ataxia telangiectasia B

CRAT-C: Costa Rica ataxia telangiectasia C

CRAT-D: Costa Rica ataxia telangiectasia D

dATP: deoxiadenosina trifosfato

dAdo: deoxiadenosina

dDNTP: didesoxinucleótido

dNTP: desoxinucleótido

HG19: Genoma Humano versión 19

HLH: Linfocitosis Hematofágica

IDP: Inmunodeficiencia Primaria

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgE: Inmunoglobulina E

IgM: Inmunoglobulina M

INDELS: Inserción o Delección

IPEX: Síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X

IUIS: Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas

JMF: Fundación JeffreyModell

LASID: Asociación Latinoamérica de Inmunodeficiencias

MLPA: *Multiplex LigandProbeAssay*

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

NK: Natural Killer

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PH: Homología con Plekstrina

PIK3: Fosfatidil inositol 3 quinasa

SCID: Inmunodeficiencia Combinada Severa

TCR: Receptor de célula T

TH: Homología con Tec

TMO: Trasplante de Médula Ósea

VEB: Virus Epstein Barr

VZV: Virus Varicela Zoster

WES: Secuenciación de Exoma Completo

WGS: Secuenciación de Genoma Completa

XLA: Agamaglobulinemia ligada al cromosoma X

XLP: Enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X

CAPÍTULO 1

1.1 Antecedentes

1.1.1 Historia de las Inmunodeficiencias Primarias

Desde principios del siglo pasado existen reportes que describen pacientes con características y manifestaciones clínicas, que posteriormente se categorizaron como inmunodeficiencias primarias (Raje y Dinakar, 2015). Por ejemplo, en 1922 W. Shultz observó que varios de sus pacientes con lesiones gangrenosas en la faringe, presentaban neutropenia severa. Posteriormente, en 1926 se asociaron manifestaciones neurológicas con telangiectasias en las conjuntivas, lo que hoy se sabe, es característico de la Ataxia Telangiectasia (Ochsa y Hitzigb, 2012).

Asimismo, en 1937 dos niños que presentaban trombocitopenia severa desde su nacimiento, tamaño reducido de sus plaquetas y episodios recurrentes de diarrea y otitis media fueron descritos por A. Wiskott. Diez años después, Aldrich describe el patrón de herencia ligado al cromosoma X de esta enfermedad. No obstante, es hasta 1968 cuando se reconoce esta enfermedad como una inmunodeficiencia primaria y se le otorga el nombre de Wiskott-Aldrich en honor a quienes la describieron por primera vez (Ochsa y Hitzigb, 2012).

El año 1952 fue particularmente importante en el campo de las inmunodeficiencias primarias, pues el coronel Odgen Bruton diagnosticó por primera vez en la historia a un paciente con agammaglobulinemia, después de observar la ausencia de la región gamma en la electroforesis de proteínas que le realizó al suero del paciente, que había cursado con diez episodios de neumonías en el último año. Además, se reconoce al Dr. Bruton como el primero en utilizar la inmunización pasiva como terapia de reemplazo a la ausencia de anticuerpos utilizando la fracción II de Cohn (Bruton, 1968).

Por otro lado, el primer reporte de niños con linfopenia severa que cursaba con consecuencias fatales fue hecho por los patólogos suizos Glanzmann y Riniker. Además, años después del descubrimiento de la agammaglobulinemia de Bruton, otro grupo de investigadores suizos reconocieron la severidad de estos dos hallazgos juntos (linfopenia y agammaglobulinemia) y los describieron en cuatro pacientes que murieron de graves infecciones fúngicas y bacterianas (Ochsa y Hitzigb, 2012). Este síndrome fue nombrado originalmente como deficiencia humoral y celular combinada. En 1970 la Organización Mundial de la Salud la denominó Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID, por sus siglas en inglés) (Stiehm y Johnston, 2005).

En 1960 un grupo de médicos en Boston describió a un paciente que ingresó al hospital con hematuria y glomerulonefritis post estreptocócica; los ensayos de determinación del complemento sérico que le realizaron demostraron una actividad aumentada. Además, cursaba con niveles séricos de IgM incrementados, así como IgG e IgA disminuidas. Eventualmente, este paciente fue reportado como el primer caso de hiper IgM en la historia (Rosen, 2000).

Lograr reconocer las inmunodeficiencias primarias como un grupo de entidades clínicas causadas por defectos en distintos componentes del sistema inmune llevó mucho tiempo de esfuerzo, aportes y progreso a nivel de salud pública. En primer lugar, se tuvo que lograr el control efectivo de infecciones mediante distintas estrategias como la vacunación infantil, adecuado control nutricional y disponibilidad de antimicrobianos, lo que permitió distinguir los pacientes que, a pesar de estas medidas, seguían presentando manifestaciones sugerentes de una falla en su sistema inmune (Ochsa y Hitzigb, 2012).

Asimismo, avances paralelos en el conocimiento de la inmunología básica y la introducción del concepto de inmunidad innata y adaptativa suscitaron el progreso en el diagnóstico y tratamiento de las inmunodeficiencias primarias.

En las últimas décadas, con el advenimiento de nuevas técnicas genómicas se abrieron oportunidades para explorar las bases moleculares de las inmunodeficiencias primarias; el uso de técnicas como secuenciación de Sanger y secuenciación masiva ha generado un enorme impacto en la evaluación, comprensión y tratamiento de estas enfermedades. Así como la creciente lista de alteraciones genéticas descritas para este heterogéneo grupo de padecimientos.

A la fecha existen más de 400 alteraciones genéticas descritas, más del 45% fueron descubiertas a partir del 2010 cuando se empezaron a utilizar técnicas de secuenciación masiva como secuenciación del exoma completo (WES) o de genoma completo (WGS) para identificar nuevos errores primarios de la inmunidad (Tangye *et al.*, 2020).

El escenario es cada vez más prometedor para los pacientes que sufren de estos trastornos. A pesar de que a través de la historia hubo muchos pacientes que no pudieron recibir el tratamiento necesario, las observaciones y descripciones de sus médicos tratantes fueron vitales para desarrollar el conocimiento actual acerca de las inmunodeficiencias primarias. No obstante, es importante difundir este conocimiento y hacer consciencia entre

profesionales de la salud y la población en general de la existencia de estas enfermedades pues se cree que la prevalencia mundial de estos trastornos está considerablemente subestimada y es mayor a la que se reporta.

1.1.2 Epidemiología

Previo al acelerado conocimiento y desarrollo en este campo, las inmunodeficiencias primarias eran consideradas enfermedades raras con una prevalencia muy baja. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que aproximadamente un 1% de la población mundial podría verse afectada, si son considerados todas las variantes de inmunodeficiencia primaria (Modell *et al.*, 2018).

Se estima que la prevalencia mundial es de 1/1000 a 1/5000 nacimientos (Tangye *et al.*, 2020). El número de casos diagnosticados globalmente en 2018 fue de 94024 personas, con un aumento del 21,8 % de casos diagnosticados en relación con el 2013 (Modell *et al.*, 2018). A pesar de esto, se calcula que alrededor de un 70% de personas viven con algún desorden primario inmune que permanece sin diagnosticar (Condino-Neto y Espinoza-Rosales, 2018).

La prevalencia de las inmunodeficiencias primarias varía de una región a otra siendo la más alta en Estados Unidos, seguido por Europa, Latinoamérica, Oriente Medio, Asia y África (Modell *et al.*, 2018). Las variaciones podrían explicarse por la gran diversidad étnica y movilidad geográfica de las poblaciones en las distintas regiones y la presencia de efectos fundadores, es decir, la reducción de variación genética que se produce cuando una pequeña población establece una nueva colonia. Así como, los contrastes socioculturales entre ellas, por ejemplo, los matrimonios entre consanguíneos (Al-Herz *et al.*, 2019).

Asimismo, las diferencias socioeconómicas, falta de instalaciones especializadas de diagnóstico, pruebas y acceso a servicios de salud generales y especializados podrían explicar las diferencias entre regiones (Condino-Neto y Espinoza-Rosales, 2018).

1.1.2.1 Prevalencia en Latinoamérica

En 1993 se fundó lo que hoy se conoce como la Asociación Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias (LASID) para estudiar la prevalencia de las IDP en diferentes regiones de Latinoamérica y promover mayor consciencia de la existencia de estos padecimientos (Ruggero y Condino-Neto, 2012).

En 2009, LASID lanzó una propuesta con el objetivo de que las instituciones de los países pertenecientes a la asociación realizaran, en línea, el registro de los distintos casos diagnosticados con IDPs. A mayo del 2021 un total de 8551 casos de IDPs han sido reportados por 128 centros pertenecientes a 17 países latinoamericanos (figura 1) (Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias, 2021).

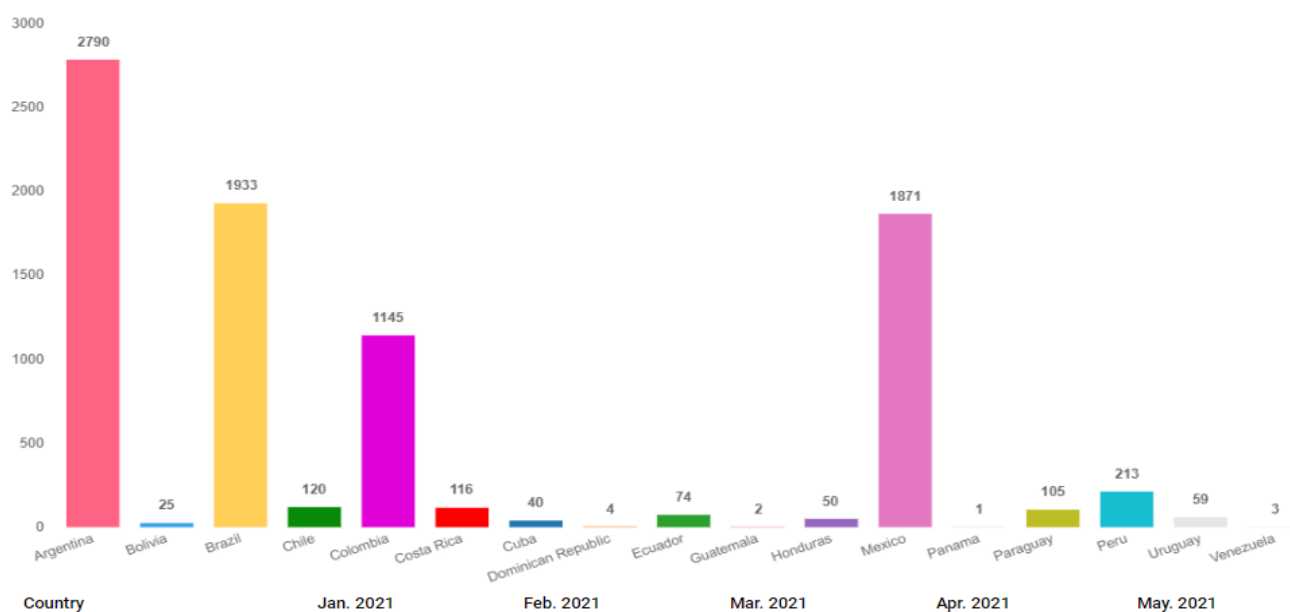


Figura 1. Total de casos registrados por país pertenecientes a LASID. (Tomado de Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias, 2021)

Costa Rica forma parte de los países participantes y al momento tiene un único centro registrado, el Hospital Nacional de Niños “Dr. Carlos Sáenz Herrera” con un reporte total de 116 pacientes (Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias, 2021).

De acuerdo con las estadísticas de LASID y agrupando a los pacientes acorde a la clasificación de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (Tangye *et al.*, 2020), la frecuencia de los diferentes tipos de IDPs en general es: deficiencias

predominantes de anticuerpos (52%), síndromes de inmunodeficiencia bien definidos (19%), inmunodeficiencias combinadas y defectos en la fagocitosis (9% ambos), desordenes autoinflamatorios (6,2%), deficiencias de complementos (2,5%), defectos en la inmunidad innata (1,3%) y desordenes de desregulación inmune (1%) (Condino-Neto *et al.*, 2015).

No obstante, en los registros ordenados por país se pueden encontrar ligeras diferencias en las frecuencias anteriores pues algunas enfermedades parecen ser más usuales en ciertas regiones; por ejemplo, en México y Costa Rica se registran más pacientes con Ataxia Telangiectasia que en otras regiones latinoamericanas (Condino-Neto *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Prevalencia en Costa Rica

Desafortunadamente, a la fecha no hay estudios epidemiológicos realizados en Costa Rica publicados en referencia a pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias.

No obstante, a partir de los registros de LASID publicados en 2013 se estima que la distribución de los diferentes tipos de inmunodeficiencias según la clasificación internacional sitúa en primer lugar a los síndromes bien definidos, dentro de los que se encuentran la Ataxia Telangiectasia y el síndrome de Wiskott-Aldrich, que representan alrededor de un 60% de las IDPs diagnosticadas en el país, seguido por las inmunodeficiencias combinadas, como las SCID, y las deficiencias de anticuerpos, por ejemplo el síndrome de Hiper IgM; con un 17% y un 11% respectivamente (Padilla, Rosales y Argumedo, 2013).

1.2 Marco Referencial

1.2.1 Definición de las Inmunodeficiencias Primarias

Las inmunodeficiencias primarias constituyen una serie de alteraciones genéticas que provocan variaciones cualitativas (pérdida o ganancia de función) y cuantitativas en diversas vías de la respuesta inmunológica. Son un grupo muy diverso de desórdenes, con mecanismos patológicos variados que generan un fallo en la defensa de nuestro organismo (De la Calle, Pérez y Puig, 2020).

No obstante, es cada vez más evidente que las IDPs no pueden reducirse únicamente a un "defecto" en la inmunidad, sino a distintos trastornos monogénicos y poligénicos que alcanzan diversos grados de inmunodeficiencia, así como de desregulación inmune (Yu, Orange y Demirdag, 2018).

Precisamente, debido a lo anterior, el diagnóstico de IDPs representa un reto para la comunidad médica pues una heterogénea gama de manifestaciones clínicas caracteriza estos padecimientos. Una misma mutación en un gen específico puede generar diversas expresiones fenotípicas (Hernández-Martínez *et al.*, 2016).

La mayoría de las IDP son trastornos con una etiología genética y son hereditarios. Por consiguiente, los patrones de herencia más comunes en estas enfermedades son el ligado al cromosoma X y el autosómico recesivo, donde la consanguinidad entre progenitores aumenta la posibilidad de padecer estos desórdenes (Hadizadeh *et al.*, 2017).

Es por lo anterior, que en un 55% de los casos, las manifestaciones clínicas de estos padecimientos se presentan al nacimiento o durante la infancia. Sin embargo, existen inmunodeficiencias que pueden manifestarse en la edad adulta, principalmente las de tipo humoral como la inmunodeficiencia común variable (Hernández-Martínez *et al.*, 2016).

La vida de los pacientes con inmunodeficiencias primarias es profundamente afectada por su condición. Al tener el sistema inmune defectuoso quedan susceptibles a sufrir una mayor cantidad de infecciones caracterizadas por recurrencia, severidad y cronicidad (Hernández-Martínez *et al.*, 2016). Asimismo, en algunas IDPs los pacientes son más propensos a sufrir infecciones de agentes infecciosos específicos dependiendo de la vía inmune afectada (Chappel *et al.*, 2014). Las IDPs también pueden presentar una amplia variedad de complicaciones no infecciosas como condiciones autoinmunes debido a variantes en genes que también están involucrados en los mecanismos de tolerancia del sistema inmune (Amaya-Uribe *et al.*, 2019).

Del mismo modo, se ha determinado una mayor tendencia al desarrollo de malignidades, en su mayoría hematológicas como los linfomas. Se ha descrito que estos pacientes tienen hasta diez veces mayor riesgo a desarrollar esta malignidad en comparación con personas sin inmunodeficiencias primarias (Herber *et al.*, 2020).

1.2.2 Clasificación general según la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS)

Las inmunodeficiencias se pueden clasificar según su origen: primario o secundario. Las alteraciones inmunes de origen primario se definieron previamente. Mientras que las inmunodeficiencias secundarias ocurren a raíz de otras causas subyacentes por ejemplo: infecciones, medicamentos, malnutrición, entre otras (Raje y Dinakar, 2015).

Ahora bien, las inmunodeficiencias primarias han sido identificadas y clasificadas a través del tiempo en concordancia con los nuevos hallazgos, mayoritariamente genéticos, que se van sumando a la larga lista de errores inmunitarios, que según la última actualización de la IUIS ya contabiliza 416 desórdenes descritos (Tangye *et al.*, 2020). De acuerdo con este último informe, las IDP se pueden clasificar, de manera general, de la siguiente forma:

- Inmunodeficiencias combinadas

Son las inmunodeficiencias causadas por una alteración en el linfocito T que repercute en otros participantes del sistema inmune como el linfocito B y las células NK. (De la Calle, Pérez y Puig, 2020). Existe un amplio abanico de entidades englobadas en este grupo; principalmente se dividen en las inmunodeficiencias combinadas severas (SCID), inmunodeficiencias menos severas que SCID y el síndrome de Ommen. Estas IDP suelen manifestarse desde el nacimiento y cursar con infecciones muy graves (Reula y De Arriba, 2019).

- Inmunodeficiencias combinadas con características sindrómicas

Este grupo constituye un conjunto heterogéneo de enfermedades que tienen un componente de alteración inmunitaria y también manifestaciones a nivel de otros órganos o sistemas. El grado de inmunodeficiencia en estas entidades es variable y la mayoría se comportan como IDP combinadas. Las más comunes son la Ataxia Telangiectasia, Wiskott-Aldrich y la microdelección 22q11.2 anteriormente conocida como el síndrome de Di George (De la Calle, Pérez y Puig, 2020).

- Deficiencias predominantemente de anticuerpos

Son de las inmunodeficiencias primarias más frecuentes para todos los grupos etarios. Son alteraciones en la producción, secreción o función de los anticuerpos

(McCusker, Upton y Warrington, 2018). Tienen un espectro clínico e inmunológico amplio; desde pacientes con una severa reducción de todos los isotipos de inmunoglobulinas y ausencia de linfocitos B (agammaglobulinemia) a pacientes con una deficiencia selectiva de producción específica de algún isotipo, siendo la deficiencia selectiva de IgA la más común de todas (De la Calle, Pérez y Puig, 2020).

- Defectos congénitos de la fagocitosis

En este grupo se engloban los defectos cuantitativos y cualitativos de los fagocitos, incluye entidades como la enfermedad granulomatosa crónica, neutropenia severa y el déficit de adhesión leucocitaria (Reula y De Arriba, 2019).

- Defectos en la inmunidad innata

Las inmunodeficiencias de la vía innata se caracterizan por ser generalmente variantes de ganancia de función, con susceptibilidad preferencial por alguna familia de microorganismos. (De la Calle, Pérez y Puig, 2020) Destacan en este grupo, los defectos en la vía de los receptores tipo *Toll*, la candidiasis mucocutánea crónica y la susceptibilidad mendeliana a micobacterias (Raje y Dinakar, 2015).

- Enfermedades de desregulación inmune

Estas inmunodeficiencias están muy relacionadas con los fenómenos de autoinmunidad debido a la desregulación total que ocurre a nivel del sistema inmune. En gran cantidad de estos desordenes los linfocitos están presentes, pero son disfuncionales provocando que se desarrolle una excesiva autoreactividad, cuyo desenlace es la autoinmunidad. En esta categoría se encuentra la linfohistiocitosis hematófaga (HLH), síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) y la poliendocrinopatía y enteropatía ligada al X (IPEX) (McCusker, Upton y Warrington, 2018).

- Deficiencias del complemento

Constituyen aproximadamente un 10% de las IDP, incluye defectos en la vía clásica, alterna y de las lectinas. Pacientes con defectos en la vía clásica frecuentemente presentan un fenotipo autoinmune mientras que pacientes con alteraciones en la vía alterna padecen usualmente de infecciones por piógenos (Raje y Dinakar, 2015).

- Enfermedades autoinflamatorias

Esta categoría de IDPs presenta características y manifestaciones muy diferentes a los demás grupos. A menudo se manifiestan con episodios inflamatorios periódicos y recurrentes con la fiebre como su principal signo. Dentro de sus entidades más frecuentes están la fiebre mediterránea familiar, y el grupo de criopirinopatías (De la Calle, Pérez y Puig, 2020).

- Fenocopias de errores de inmunidad congénitos

Son enfermedades mediadas por anticuerpos o generadas por mutaciones somáticas que cursan con presentaciones clínicas muy similares a las de algunas inmunodeficiencias primarias (De la Calle, Pérez y Puig, 2020; Raje y Dinakar, 2015).

1.2.3 Diagnóstico general de las inmunodeficiencias primarias

La mayoría de las IDPs son detectadas en la infancia, sin embargo, en muchos casos este diagnóstico se puede retrasar. El tiempo transcurrido desde la presentación inicial hasta el establecimiento de un diagnóstico, o “*Diagnosis Lag*”; término utilizado por algunos autores, puede ser tan prolongado como 12 años, incluso en lugares con herramientas diagnósticas y centros especializados como Estados Unidos (El-Sayed y Radwan, 2020).

El diagnóstico precoz de las inmunodeficiencias primarias es fundamental para instaurar un abordaje terapéutico adecuado y eficaz previo a la aparición de daños posiblemente irreversibles o mortales en los pacientes afectados (Martín-Mateos, 2011).

Por lo tanto, es imprescindible el papel del clínico para identificar distintas manifestaciones y signos presentes en el paciente, lo cual puede resultar retador pues una misma IDP puede desarrollar distintas manifestaciones y la mayoría de las IDPs carecen de características patognomónicas (Raje y Dinakar, 2015). Asimismo, el rol del laboratorio clínico y los distintos análisis generales y especializados que ofrece son fundamentales para poder culminar en un diagnóstico certero.

1.2.3.1 Análisis de la historia clínica del paciente

Un aspecto primordial por considerar cuando se sospecha de una IDP, es la historia clínica del paciente. La elaboración de una historia clínica correcta destacando

antecedentes familiares de afectaciones inmunes, abortos espontáneos, muerte prematura o consanguineidad entre progenitores es información esencial que contribuye a un posible diagnóstico (Martín-Mateos, 2011).

Por otro lado, hallazgos a nivel físico como: retraso en el crecimiento y desarrollo, ausencia de órganos linfoides secundarios, alteraciones en piel como eczemas, granulomas, petequias, entre otras, son características clásicas que pueden sugerir una inmunodeficiencia primaria (Raje y Dinakar, 2015; Abolhassani *et al.*, 2015).

Una de las principales manifestaciones de una inmunodeficiencia es la susceptibilidad aumentada a infecciones que suelen ser recurrentes, severas y refractarias al tratamiento (Martín-Mateos, 2011). Es clave para el diagnóstico poder reconocer el espectro de los agentes patógenos causales. Generalmente se muestra un patrón típico característico para cada categoría de IDP (Jesenak *et al.*, 2014).

Por ejemplo, infecciones sinopulmonares por bacterias encapsuladas, infecciones gastrointestinales por *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, y enterovirus; infecciones respiratorias, digestivas y cutáneas por microorganismos oportunistas como micobacterias atípicas, *Candida* sp, *Aspergillus* sp, *Histoplasma* sp y *Pneumocystis jirovecii*, virus como VEB, CMV y VVZ e infecciones por *Neisseria* sp. Además, infecciones invasivas, tales como encefalitis, meningitis, osteomielitis, abscesos de órganos profundos, bacteriemias, neumonías complicadas, neumatoceles y abscesos o fístulas recurrentes cutáneas o de tejidos blandos (Martín-Mateos, 2011).

Por otro lado, los síntomas y sospecha clínica de inmunodeficiencia pueden variar en función de la edad. Por consiguiente, como regla general, entre más temprano ocurran la aparición de los síntomas, más severo y mortal puede ser el defecto inmune; en niños menores de 6 meses es posible encontrar manifestaciones y signos acordes con inmunodeficiencias combinadas severas y algunos síndromes bien definidos como el Wiskott-Aldrich y el Síndrome 22q11 (Di George) así como defectos de la fagocitosis como el déficit de adhesión leucocitaria (Abolhassani *et al.*, 2015).

No obstante, el diagnóstico puede ser desafiante a esta edad. La dificultad, en parte, proviene de la inmadurez natural del sistema inmune neonatal que puede enmascarar los déficits inmunes y complicar la interpretación de los hallazgos clínicos y los análisis de laboratorio (El-Sayed y Radwan, 2020).

Por otra parte, es más probable encontrar hallazgos clínicos sugerentes de inmunodeficiencias humorales en infantes mayores de 6 meses cuando la concentración plasmática de inmunoglobulinas maternas de tipo IgG, que adquirieron a través de la placenta, decrece y se hace más evidente la inmunodeficiencia, principalmente en casos como la agammaglobulinemia ligada al X (XLA) (Abolhassani *et al.*, 2015).

Por otro lado, en cualquier rango de edad la presencia de dos o más infecciones invasivas, como meningitis o sepsis por *Neisseria* son sugestivas de defectos a nivel de complemento (Martín-Mateos, 2011).

Ahora bien, existen múltiples compendios de signos de alarma que abarcan distintas presentaciones clínicas en adultos y niños, que sugieren la posibilidad de una IDP en el paciente. La fundación de Jeffrey Modell (JMF) en la década de los noventa publicó diez signos de alarma de las inmunodeficiencias primarias, que han sido actualizados a través del tiempo por consenso entre diferentes expertos (Modell *et al.*, 2018).

- Cuatro o más otitis *de novo* en el año
- Dos o más sinusitis en un año
- Dos o más meses de tratamiento antibiótico con poco efecto
- Dos o más neumonías en un año
- Fallo o retraso del niño en el crecimiento y ganancia de peso
- Abscesos profundos en órganos o piel
- Aftas persistentes en la boca o infección micótica en la piel
- Necesidad de antibióticos por vía intravenosa para eliminar infecciones
- Dos o más infecciones profundas, incluida una septicemia
- Antecedentes familiares de IDP

1.2.3.2 Diagnóstico de laboratorio

El rol del laboratorio en el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias constituye, en conjunto con los signos clínicos observados, una fuente primaria de información utilizada para generar un panorama más completo, que permita definir el defecto inmune. Los análisis de laboratorio comprenden desde una evaluación básica hasta análisis específicos y especializados. El uso óptimo de pruebas de laboratorio proporciona una herramienta fundamental para el diagnóstico y caracterización de inmunodeficiencias primarias (Abraham, 2011).

Los estudios iniciales empiezan con el hemograma y el diferencial de sangre periférica lo que permite evaluar si hay linfopenia, neutropenia o leucopenia significativa y anomalías morfológicas a nivel de leucocitos y plaquetas (McCusker, Upton y Warrington, 2018). La cuantificación de inmunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) y los subtipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), aunado a la determinación de anticuerpos vacunales pueden ayudar a descartar la presencia de inmunodeficiencias de tipo humoral (Reula y De Arriba, 2019). El análisis de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias para cuantificación e inmunofenotipificación por medio de citometría de flujo, permiten analizar el compartimento celular del sistema inmune: linfocitos T, B y células NK. Además, pruebas más especializadas y dirigidas de laboratorio como el ensayo de linfoproliferación y el ensayos de evaluación de la fagocitosis y estallido respiratorio (NBT) también proveen importante información para orientación diagnóstica (Abolhassani *et al.*, 2015). La interpretación de estos resultados siempre debe ubicarse dentro del contexto del paciente y su escenario clínico actual (Locke, Dasu y Verbsky, 2014).

Tabla 1
Pruebas inmunológicas básicas utilizadas para el diagnóstico de IDP

Tipo de inmunidad	Compartimento Específico	Pruebas de laboratorio	Enfermedades asociada a resultados anormales	
Inmunidad innata	Fagocitos	Diferencial y hemograma NBT Test de Dihidroramina	Neutropenia congénita, déficit de adhesión leucocitaria, enfermedad granulomatosa crónica	
	Complemento	CH50 AH50 Cuantificación de C3 y C4 Cuantificación C1q	Desórdenes de deficiencias de proteínas individuales de complemento Angioedema hereditario	
		Linfocitos T	Diferencial y hemograma Ensayos de linfoproliferación Determinación de poblaciones y subpoblaciones por citometría de flujo (CF), inmunofenotipo y cuantificación	SCID/CID, Di George, Wiskott-Aldrich, Síndrome linfoproliferativo autoinmune, XLP, linfocito desnudo.
		Linfocitos B	Diferencial y hemograma Determinación de subpoblaciones por CF, inmunofenotipo y cuantificación	SCID/CID, Di George, Síndrome de Ommen, XLA, Hiper IgM
Inmunidad adaptativa	Inmunoglobulinas	Determinación de niveles séricos Determinación de subclases de inmunoglobulinas Respuesta a vacunas Determinación de isohemaglutininas	XLA, inmunodeficiencia común variable, HiperIgM, HiperIgE, Deficiencias selectivas de anticuerpos,	

Nota: Modificado de Walkovich y Connelly, 2016.

La evaluación del laboratorio de las inmunodeficiencias primarias es compleja pero esencial para la atención de estos pacientes. Realizar las pruebas de manera sistemática y escalonada es importante para llegar a un diagnóstico correcto sin pruebas innecesarias. A través de este enfoque los médicos pueden proporcionar decisiones apropiadas y dirigidas que benefician a sus pacientes (Locke, Dasu y Verbsky, 2014).

No obstante, en muchas ocasiones los resultados obtenidos de los hallazgos clínicos, radiológicos y los análisis inmunológicos de laboratorio, no son lo suficientemente contundentes para lograr un diagnóstico certero de una inmunodeficiencia primaria o realizar un abordaje terapéutico específico adecuado. El diagnóstico de IDP a menudo requiere la correlación de estos resultados con pruebas genéticas. Por consiguiente, el análisis molecular, en algunos casos, puede jugar un papel crucial y decisivo (Abraham, 2011).

1.2.3.3 Técnicas de diagnóstico molecular

El diagnóstico genético es parte crítica del manejo moderno del paciente y debe ser considerado, cuando es posible, como el estándar de atención. La identificación de la base molecular del trastorno logra asegurar el diagnóstico, en el caso de muchas enfermedades monogénicas con patrón de herencia mendeliana (Ameratunga *et al.*, 2010).

El diagnóstico molecular es útil para dilucidar la correlación entre el fenotipo y el genotipo en presencia de variantes alélicas o manifestaciones inusuales. Asimismo, está el papel de las pruebas genéticas en la identificación de individuos asintomáticos, que portan un gen defectuoso asociado a una IDP potencialmente letal, previo al inicio de la presentación clínica y manifestaciones inmunológicas de la enfermedad, lo que facilita la intervención terapéutica temprana (Abraham, 2011).

Este proceso se ha facilitado por la rápida evolución de las plataformas de pruebas moleculares. A medida que las modalidades diagnósticas avanzadas se aplican de manera más amplia, la información recibida es cada vez mayor y debe interpretarse adecuadamente para proporcionar la mejor atención clínica a los pacientes (Ameratunga *et al.*, 2010).

El término diagnóstico genético engloba a todas aquellas acciones y técnicas que se llevan a cabo para determinar o detectar las causas genéticas de una enfermedad. Las principales utilidades del diagnóstico genético incluyen el tamizaje neonatal, pruebas de detección de portadores, diagnóstico prenatal, diagnóstico, pronóstico, o ambos y pruebas

predictivas o de predisposición (The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services, 2009). No obstante, tienen una alta complejidad asociada y una de las razones es que los trastornos genéticos son causados por gran cantidad de mecanismos diferentes y por ende se deben utilizar distintos abordajes y técnicas para su diagnóstico.

1.2.4 Manejo general de las inmunodeficiencias primarias

Hasta hace pocos años, los tratamientos para IDPs eran en gran medida de soporte, con la excepción del trasplante de médula ósea. Sin embargo, los recientes avances en inmunobiología, genética, la explosión del descubrimiento y la comercialización de tratamientos biológicos han cambiado el panorama y las oportunidades en inmunología clínica. Las opciones terapéuticas y la esperanza de vida de los pacientes con IDPs también han mejorado dramáticamente, en gran parte como resultado de una mejor prevención y tratamiento de infecciones, así como una mejor comprensión y terapia de las complicaciones como malignidades y autoinmunidad (Marciano y Holland, 2017).

Por lo anterior, si bien se disminuye la mortalidad relacionada con la infección en los primeros años de vida, es necesario anticipar la aparición de otras afecciones que anteriormente no se apreciaban; como tumores malignos y trastornos degenerativos desentascarados por el aumento de la longevidad (Marciano y Holland, 2017).

- Manejo general

Existen principios generales del manejo y tratamiento de las inmunodeficiencias primarias que buscan mejorar la calidad de vida del paciente mientras se logra un abordaje terapéutico más específico según el tipo de inmunodeficiencia y que se debe mantener en paralelo cuando este se aplique. A los pacientes con IDPs se les debe brindar (Reula y De Arriba, 2019):

- Soporte nutricional
- Evitar vacunación con microorganismos vivos atenuados
- Profilaxis antibiótica
- Soporte emocional y psicológico

CAPÍTULO 2

2.1 Justificación

Las deficiencias inmunes primarias constituyen un amplio rango de desórdenes con una clínica y genética asociada muy heterogénea. Tradicionalmente, han sido consideradas como enfermedades raras, no obstante, el surgimiento de novedosas técnicas moleculares ha resultado en un aumento exponencial en el número de genotipos identificados causantes de inmunodeficiencias primarias.

Lo anterior, ha permitido determinar los roles de genes individuales y sus productos en la función inmune, propiciando el desarrollo de mejores abordajes terapéuticos basados en los mecanismos inmunopatológicos de las distintas enfermedades.

Actualmente, el tiempo que se necesita para realizar un diagnóstico adecuado de una inmunodeficiencia primaria varía entre 9 meses a 4,7 años. Lo anterior, debido a que las presentaciones clínicas de estos desórdenes, en muchos casos se traslapan entre sí, con fenotipos y síntomas semejantes, o bien son presentaciones clínicas muy atípicas. Es por esto, que en algunos casos se realizan intervenciones tardías o inadecuadas lo cual implica severas consecuencias para los pacientes tanto en el deterioro físico como psicológico.

La detección de una variante patogénica asociada a algún desorden inmune primario, en pacientes con un fenotipo congruente, permite determinar un diagnóstico molecular definitivo, el cual en muchos casos se logra establecer incluso antes del inicio de los síntomas y signos característicos como las infecciones recurrentes, que constantemente ponen en riesgo a los pacientes y son potencialmente fatales. Con un diagnóstico temprano se puede realizar una intervención oportuna capaz de corregir el defecto detectado, como el trasplante de médula ósea y para algunos casos otras alternativas terapéuticas más precisas, basadas en la modificación de la vía de señalización en la que está involucrado el producto del gen mutado, lo cual es sólo posible conociendo cual es la variante implicada.

Los tratamientos incluso pueden ser diferentes para una misma enfermedad dependiendo de la variante que tenga el paciente y por ende pueden ser más dirigidos. Lo anterior, puede implicar un desenlace distinto en el curso de la enfermedad y la sobrevivencia del paciente. El diagnóstico molecular puede ofrecer información que pronostique la severidad de la enfermedad en determinados casos y la posibilidad de brindar asesoramiento genético a los familiares.

En el presente trabajo, se pretende realizar una revisión sistemática del estado actual del diagnóstico molecular en inmunodeficiencias primarias. Asimismo, se pretende comprobar que las técnicas moleculares permiten disminuir significativamente el tiempo que toma llegar a un diagnóstico certero y por consiguiente a la determinación de una estrategia terapéutica y un manejo más adecuado para el paciente, lo cual genera un gran impacto en el desenlace de su enfermedad, su expectativa de vida y la calidad de esta.

2.2 Problema de investigación

Descripción del diagnóstico molecular en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias en Costa Rica, para una intervención clínica temprana.

2.3 Objetivo General

Describir el estado actual del diagnóstico molecular como herramienta diagnóstica, que permite pronosticar y llevar a cabo el abordaje terapéutico temprano, en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias en Costa Rica.

2.4 Objetivos Específicos

- 2.4.1 Describir las técnicas moleculares más utilizadas actualmente para realizar el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias.
- 2.4.2 Identificar las principales inmunodeficiencias primarias que se reportan en pacientes pediátricos en Costa Rica.
- 2.4.3 Analizar el efecto de las principales variantes patogénicas descritas sobre el pronóstico y la estrategia terapéutica a desarrollar.

CAPÍTULO 3

3. Marco Metodológico

Tipo de estudio

Revisión bibliográfica de la literatura.

Criterios de inclusión

Artículos en los idiomas español e inglés. Además se incluyeron revisiones sistemáticas, meta análisis, revisiones de la literatura, tesis doctorales, libros de texto y comunicaciones personales con expertos. Se revisaron artículos publicados a partir del 2005. Artículos basados en estudios en humanos.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los artículos no revisados por pares y artículos no indexados.

Recolección de datos

Los artículos y datos utilizados para esta revisión se extrajeron de las siguientes bases de datos electrónicas: MEDLINE a través de la interfaz PUBMED, EMBASE y EBSCO, ScienceDirect y bases de datos específicas como LASID, OMIM, *Human Gene MutationDatabase*, VARSOME yClinVar.

Metodología

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos seleccionadas utilizando las siguientes palabras clave: *Inmunodeficiencia primaria, diagnóstico molecular, Secuenciación de Nueva Generación, Paneles de inmunodeficiencias.*

Posteriormente, se procedió a leer los títulos y resúmenes de los artículos y se aplicaron los criterios de selección y exclusión establecidos para elegir los artículos que se leyeron en su totalidad. Además, se sistematizaron utilizando el gestor de datos Mendeley para organizar y categorizar por temas y subtemas los artículos. (Figura 2)

Análisis de la información

Se realizó una síntesis de los aspectos que se consideren más relevantes para la investigación. La información se organizó y se discutió para obtener conclusiones y recomendaciones al respecto. (Figura 2)

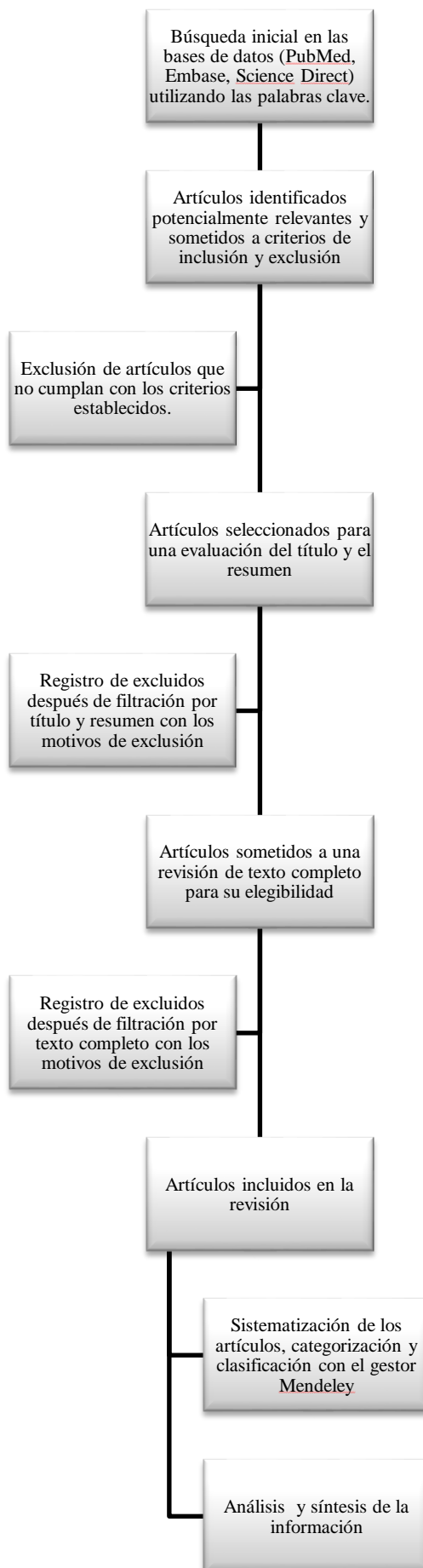


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología

CAPÍTULO 4

4. Técnicas moleculares utilizadas para el diagnóstico de inmunodeficiencias primarias

En el laboratorio clínico, la información de la secuencia de ADN (el orden de los nucleótidos de una molécula de ADN) se usa de manera rutinaria para una variedad de propósitos, incluida la identificación de haplotipos humanos, la designación de polimorfismos y la detección de variantes genéticas (Buckinham, 2019).

Existen múltiples opciones disponibles para el diagnóstico genético, dependiendo del tipo de variación que se quiera identificar, cada una con sus ventajas y limitaciones específicas. Las técnicas moleculares más utilizadas a nivel clínico son la secuenciación de Sanger o de primera generación, el MLPA y más recientemente la secuenciación masiva, o de segunda generación, con cada una de sus variaciones (Chinn *et al.*, 2019).

Ahora bien, la determinación directa del orden de nucleótidos, o secuencia, de una molécula de ADN es el método más específico y directo de identificar variantes genéticas, especialmente aquellas que cambian en uno o pocos nucleótidos. Uno de los métodos desarrollados más utilizados para lo anterior es la secuenciación de Sanger (Buckinham, 2019).

4.1 Secuenciación de Sanger

Fue desarrollada por Frederick Sanger a finales de la década de los 70 (Sanger, 1977). Hasta hace poco tiempo, con el advenimiento de nuevas técnicas de secuenciación, esta era la única técnica disponible para detectar mutaciones puntuales como el cambio de un nucleótido o pequeñas deleciones o inserciones (*INDELS*). No obstante, es considerada la técnica estándar de oro por su alta sensibilidad y especificidad (Chinn *et al.*, 2019). La técnica se basa en la utilización de dideoxinucleótidos (ddNTPs), nucleótidos con una modificación química en la desoxirribosa donde se sustituye el 3' -OH para detener la síntesis de la cadena de ADN (Sanger, 1977).

En primera instancia, para la reacción de secuenciación se utiliza un cebador específico que se une a la región genética de interés y, en presencia de los 4 nucleótidos (dNTPs) necesarios para la construcción del ADN, los ddNTPs y la ADN polimerasa, se extiende el cebador utilizando la cadena de ADN existente del paciente como plantilla. La creación de esta cadena complementaria se detiene cuando se incorporan ddNTPs marcados con colorantes fluorescentes. Lo anterior, crea fragmentos de ADN de longitud

variada que se pueden usar para leer la secuencia de ADN, utilizando un equipo de electroforesis capilar que separa los fragmentos de acuerdo al peso molecular, acoplado a un láser que va a excitar y detectar los fluorocromos de los ddNTPs. Posteriormente, se analizan los datos de la secuencia obtenida y se compara con una secuencia de referencia (Heimall, 2019).

4.2 MLPA (*Multiplex Ligand Probe Assay*)

Existen variantes que generan cambios en el ADN de más de 50 pb, conocidas como variantes estructurales y, a su vez, pueden ser variantes copia neutral, por ejemplo, una inversión; o variantes del número de copia (*CNV*, por sus siglas en inglés) definidas como variantes en el número de copias de regiones mayores de 1 kb de ADN, que muestran diferencias respecto al número de copias en la población normal, es decir, grandes pérdidas o ganancias de una región de ADN que alteran el estado diploide (Chinn *et al.*, 2019). Para la detección de estos últimos existe la técnica de MLPA.

La técnica de *MLPA* se basa en la hibridación de conjuntos de sondas, cada una de los cuales consta de dos mitades, con ADN genómico. La primera mitad consiste en una secuencia específica complementaria a la secuencia de interés (20-30 nucleótidos) flanqueada por una secuencia de cebador universal que puede generarse sintéticamente. La otra mitad también tiene una secuencia específica de la secuencia objetivo en un extremo (25-43 nucleótidos) y una secuencia de cebador universal en el otro, pero además, tiene un fragmento aleatorio de longitud variable entre (19-370 nucleótidos) para generar las diferencias de tamaño necesarias en las sondas para permitir la resolución electroforética específica (Sellner y Taylor, 2004).

Las dos mitades de la sonda están diseñadas de tal manera que las secuencias específicas de cada una se unen adyacente al ADN de interés y luego pueden unirse entre ellas mediante el uso de una ligasa. Esto genera una sonda complementaria flanqueada por cebadores universales que luego puede amplificarse por PCR, mientras que las mitades de sonda no unidas no pueden amplificarse. Las cantidades de sonda ligada producidas serán proporcionales al número de copias de la secuencia objetivo, y después de la amplificación por PCR, se realiza un análisis del tamaño y cantidad de los fragmentos, que indican si existe eliminación o duplicación de la secuencia (Sellner y Taylor, 2004).

4.3 Secuenciación masiva

La secuenciación de ADN de alto rendimiento de nueva generación (NGS) se refiere a un grupo de plataformas de secuenciación que procesan fragmentos de secuencias de ADN derivadas de cebadores y utilizando el ADN del paciente como plantilla (Heimall, 2019). Por lo tanto, se pueden secuenciar millones o miles de millones de fragmentos de ADN al mismo tiempo (Stranneheim y Wedell, 2016).

En primera instancia es necesario preparar y amplificar las librerías, es decir, las regiones del genoma que se desean secuenciar. Existen distintas formas para la preparación de las librerías; una de ellas es la captura por hibridación, en donde se digiere aleatoriamente el ADN del paciente con enzimas de restricción y se capturan los fragmentos digeridos específicos que se desea secuenciar. La captura se realiza mediante sondas complementarias a las regiones de interés, que pueden encontrarse en una solución líquida marcadas con biotina. Lo anterior, permite la captura con perlas magnéticas acopladas con estreptavidina (Voelkerding, Dames y Durtschi, 2009). Todos los fragmentos que se obtienen terminan en dos extremos comunes. Esto permite la posterior amplificación de los fragmentos utilizando cebadores comunes. Los cebadores tienen además, una característica importante: después de la zona complementaria a los extremos 5' y 3', disponen de una secuencia denominada "Índice" que funciona como un código de barras para identificar la muestra de cada paciente. Asimismo, disponen de otra secuencia denominada "adaptadores", importantes para el proceso de secuenciación, estos son específicos del sistema de secuenciación masiva a utilizar (Voelkerding, Dames y Durtschi, 2009).

Los pasos subsecuentes son la amplificación y secuenciación de las librerías. La amplificación involucra una base sólida de amplificación de los fragmentos de ADN para producir una señal fuerte y detectable necesaria para el paso de secuenciación. Existen dos plataformas principales disponibles para lo anterior: Illumina® y Thermo Fisher® (Voelkerding, Dames y Durtschi, 2009). Ambos se basan en el principio de secuenciación por síntesis que implica la incorporación de nucleótidos, dependientes de la ADN polimerasa, en la cadena de ADN extendida sobre la base de amplificación (Slatko, Gardner y Ausubel, 2019).

a) Sistema Illumina®:

La tecnología de Illumina® se fundamenta en una técnica conocida como "amplificación en puente" en la que se utilizan moléculas de ADN de aproximadamente 500 pb, con adaptadores ligados en cada extremo que sirven como sustratos para las reacciones de amplificación en el soporte sólido (celda de flujo) que contiene secuencias de oligonucleótidos complementarias a los adaptadores ligados. Los oligonucleótidos de la celda están espaciados de manera que el ADN al ser sometido a varios ciclos de amplificación, crea "agrupaciones" clonales o *clusters* que constan de aproximadamente 1000 copias de cada fragmento de oligonucleótidos. (<https://www.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/dna.html>) Cada celda puede soportar millones de reacciones de grupos paralelos. Durante las reacciones de síntesis, los nucleótidos correspondientes a cada una de las cuatro bases, marcados con un terminador fluorescente reversible, se incorporan y luego se detectan. Por lo tanto, la secuenciación se basa en la lectura óptica de la incorporación de nucleótidos modificados mediante una ADN polimerasa. Se incorpora un único dNTP unido al terminador reversible marcado con fluorescencia en la cadena de ácido nucleico durante cada ciclo de secuenciación, y se obtiene una imagen de la señal fluorescente resultante. El terminador y el tinte fluorescente se escinden del dNTP incorporado para permitir que se agregue el siguiente dNTP marcado complementario. Las reacciones se repiten durante 300 o más ciclos (Slatko, Gardner y Ausubel, 2019).

Además, las plataformas Illumina® realizan secuenciación de extremos emparejados (*paired-end*), es decir, la secuenciación se produce desde ambos extremos de un fragmento de ADN, lo que genera datos de secuencia de alta calidad con una alta cobertura en profundidad y un gran número de lecturas (Hu *et al.*, 2021).

La secuenciación de Illumina® permite utilizar gran variedad de protocolos que incluyen secuenciación de genoma completo, secuenciación dirigida con paneles específicos, exoma completo, metagenómica, secuenciación de ARN y métodos de metiloma. Los diferentes equipos de secuenciación de Illumina® proporcionan distintos niveles de rendimiento, algunos de sus modelos son el MiniSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq y HiSeq (Hu *et al.*, 2021).

b) Sistema Thermo Fisher®:

Las reacciones de secuenciación de Ion Torrent ocurren en millones de pozos que cubren un chip semiconductor que, a su vez, contiene millones de píxeles que convierten la información química en información de secuenciación (Hu *et al.*, 2021).

Los fragmentos de ADN se unen a una perla mediante secuencias complementarias, posteriormente se amplifican en la perla mediante PCR en emulsión. En este caso la mezcla de reacción consiste en una emulsión agua en aceite creada para encapsular los complejos entre el ADN y las perlas cubiertas con adaptadores complementarios, los desoxinucleótidos (dNTP), cebadores y la ADN polimerasa dentro de las micelas. Tras la emulsión, se lleva a cabo la amplificación. Este proceso permite que millones de perlas tengan, cada una, múltiples copias de una secuencia de ADN (Slatko, Gardner y Ausubel, 2019). A continuación, las perlas se hacen fluir a través del chip semiconductor Ion Torrent que consta de una cámara de flujo y un sensor de pH complementario de semiconductores de óxido metálico (CMOS), además la cámara de flujo contiene pocillos de modo que se ubique una sola perla por pozo (Hu *et al.*, 2021). Posteriormente, los reactivos de secuenciación fluyen a través de los pocillos y, cuando se incorpora el nucleótido apropiado, se libera un ion hidrógeno y se registra una señal que es detectada por el sensor de pH CMOS (Slatko, Gardner y Ausubel, 2019).

Una de las principales ventajas del sistema es que no se necesita cámara, fuente de luz ni escáner; la incorporación de nucleótidos se convierte directamente en voltaje que se registra directamente, acelerando enormemente el proceso. Esta tecnología cuenta con dos equipos el PGM y S5. (<https://www.thermofisher.com/cr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html>)

Ahora bien, hay disponibles gran cantidad de opciones de ensayos de secuenciación masiva de alto rendimiento para diagnóstico genético, incluidos los paneles de genes dirigidos (TGP), la secuenciación del exoma completo (WES) y la secuenciación del genoma completo (WGS), como se mencionó anteriormente. Estos son eficaces para la identificación principalmente de variantes de un solo nucleótido (SNV) e

inserciones/deleciones (indels). Sin embargo, cada opción de prueba varía en cuanto a su amplitud, complejidad del análisis de datos y limitaciones técnicas (Lee y Abraham, 2021).

- Paneles de genes dirigidos

Los paneles de genes dirigidos son un conjunto de objetivos genéticos personalizables que cubren un grupo conocido de genes causantes de enfermedades. Estos paneles pueden incluir exones así como, algunas regiones intrónicas o regiones reguladoras de importancia clínica conocida, que a menudo se excluyen de la secuenciación del exoma completo (Richardson *et al.*, 2018). Debido a la mayor profundidad y cobertura de los genes en estos paneles, muchos pueden detectar mosaicismo, deleciones y duplicaciones a nivel de exón (CNV pequeños). Además, la complejidad de análisis de datos es menor y hay menor riesgo de hallazgos incidentales en comparación con otras pruebas (Lee y Abraham, 2021). Por consiguiente, se realiza una secuenciación simultánea de múltiples genes para los que se han descrito variantes patogénicas y se conoce que están asociados a inmunodeficiencias primarias. Existen paneles más específicos que contienen genes que están asociados a un solo tipo de inmunodeficiencia primaria o paneles que abarcan un mayor número de genes asociados más tipos de IDPs (Chinn *et al.*, 2019).

El Hospital Nacional de Niños utiliza un panel de 200 genes, GeneSGKit de la empresa Sistemas Genómicos, asociado con las principales inmunodeficiencias primarias descritas. Además, cuenta con un panel mayor de Illumina®, TruSightOne®, que contiene 3400 genes asociados a diferentes patologías, incluyendo genes asociados a inmunodeficiencias primarias.

- Secuenciación de exoma completo

La secuenciación de exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) se refiere a la secuenciación de las regiones codificantes de todos los genes conocidos que comprenden el genoma completo (Richardson *et al.*, 2018). Las plataformas existentes no son capaces de secuenciar el 100% del exoma, WES cubre más del 90% del exoma humano y la mayoría (85%) de variantes patogénicas conocidas con respecto a las IDP (Chinn *et al.*, 2019). La cobertura de secuenciación puede ser deficiente particularmente en regiones del genoma con alto contenido de guanina-citosina (GC), que generalmente son más zonas más difíciles de secuenciar; áreas con secuencias repetitivas, regiones de alta homología o regiones compartidas con pseudogenes (Lee y Abraham, 2021).

La secuenciación de exoma completo permite identificar variantes en genes asociados con una presentación clásica o atípica expandiendo así el fenotipo de determinado padecimiento, o puede identificar una variante genética que resulte en una nueva asociación gen-enfermedad (Lee y Abraham, 2021).

- Secuenciación de genoma completo

La secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) cubre todo el espectro del ADN humano, incluidas las regiones codificantes y no codificantes. Ofrece una cobertura genómica más homogénea ya que no requiere PCR previa o enriquecimiento de hibridación. El número de copias y las variantes estructurales pueden evaluarse con menos potencial de sesgo que con paneles o WES. Aunque la cobertura vertical es más homogénea, la profundidad de las lecturas obtenidas es la menor de las tres técnicas de secuenciación (Richardson *et al.*, 2018).

El WGS es adecuado para la identificación de rasgos mendelianos complejos, así como para fenotipos esporádicos causados por CNV de *novo*, variantes de un solo nucleótido o Indels no descritas previamente (Chinn *et al.*, 2019).

Actualmente solo hay unos pocos laboratorios clínicos en el mundo que ofrecen WGS, debido al costo y la complejidad de los análisis de datos, lo que se puede atribuir a la gran cantidad de información que se genera. Asimismo, con la inclusión de regiones no codificantes del genoma, es más probable que se identifiquen gran cantidad de variantes de significado incierto lo cual puede representar todo un reto para el equipo médico y de laboratorio con el fin de evaluar las variantes y determinar si son relevantes o no de acuerdo al fenotipo del paciente (Lee y Abraham, 2021).

Tabla 2

Comparación entre métodos moleculares utilizados para el diagnóstico de IDP

	Cobertura	Ventajas	Limitaciones
Secuenciación de Sanger	Un único gen o exones de un gen	Alta sensibilidad (99%) Relativamente bajo costo Resultados obtenidos en poco tiempo	No se detecta mosaicismo, CNVs, ni variantes de porciones de genes no incluidas Se requiere de una sospecha diagnóstica definida Dependiente de síntesis de cebadores que incluyan de región de interés
MLPA	Dependiente del kit	Detección de CNVs Detección de ausencia total o de heterocidad	No se detectan variantes de nucleótido único o INDELS Se requiere de una sospecha diagnóstica definida Se debe tener el kit específico Técnica puede ser afectada por polimorfismos o mutaciones de un solo nucleótido
Paneles de genes con NGS	Múltiples genes	Secuenciación simultánea de múltiples genes Adecuada profundidad de cobertura Se genera una cantidad de datos más manejables para análisis Menor costo que WES y WGS Menos posibilidad de hallazgos incidentales Se pueden inferir CNVs	No se detecta variantes en regiones no codificantes, defectos en genes no incluidos en panel Requiere de una sospecha diagnóstica Se necesitan actualizar conforme van aumentando el número de variantes en genes descubiertos
WES	Todo la región codificante del genoma	Detección de nuevas variantes patogénicas en genes No hay limitación de genes a secuenciar Menor costo que WGS	No detección de variantes en regiones no codificantes Detección limitada de CNVs Hallazgos incidentales Mayor costo que Sanger y paneles Se necesitan equipos más complejos y caros Menor cobertura vertical Mayor tasa de error de secuenciación
WGS	Todo el genoma, regiones codificantes y no codificantes	Detección de CNVs y variantes estructurales Descubrimiento de nuevas variantes en genes que causen enfermedad Detección de mosaicismo	No detección de variantes en regiones no codificantes Hallazgos incidentales Se necesitan equipos más complejos y caros La cantidad de datos generados es difícil de analizar Requieren de mayor tiempo y costo Menor cobertura vertical Menor sensibilidad

Nota: Modificado de Chinn *et al.*, 2019

4.3.1 Análisis bioinformático

Posterior al proceso de secuenciación, el análisis de los resultados es el mismo para todos los sistemas de secuenciación masiva. Con las nuevas tecnologías han llegado los desafíos de la implementación de técnicas de procesamiento y validación para clasificar conjuntos de datos cada vez más grandes (Richardson *et al.*, 2018). Es decir, se genera una gran cantidad de información que hay que saber gestionar. En términos generales, se realizan tres análisis:

- Análisis primario: el equipo genera un archivo donde se observa la secuencia de nucleótidos y se aplican ciertos procedimientos de control de calidad como el filtrado y depuración de lecturas (Zhang, 2016). La información de la secuencia se registra junto con los puntajes de calidad (valores Phred) y se almacena en un formato FASTQ (Hu *et al.*, 2021).
- Análisis secundario: se alinea cada una de las secuencias obtenidas contra el genoma humano (actualmente la versión HG19) y se buscan las diferencias entre ambos. En secuenciación masiva el archivo donde se alinean las secuencias contra el genoma de referencia se almacena en un formato de alineación/mapa binario (archivo BAM). Las alineaciones se pueden ver utilizando un software de libre acceso, como el visor de genoma interactivo (IGV) (Hu *et al.*, 2021). Se determinan cada una de las diferencias encontradas entre la secuencia blanco y la secuencia de referencia (Zhang, 2016). Los datos de variación de secuencia se almacenan en un formato de determinación de variante (VCF, variant call format) (Hu *et al.*, 2021).
Un indicador de calidad para la evaluación en esta etapa es la profundidad y la amplitud de la cobertura, que incluye el número de veces que se secuencia una base y el porcentaje del genoma de referencia cubierto, respectivamente.
- Análisis terciario: consiste en determinar el significado clínico que tienen esas diferencias/variaciones (Zhang, 2016). A pesar de los avances en la tecnología informática, este proceso aún requiere experiencia clínica y juicio y no se puede automatizar en este momento. La evaluación de la patogenicidad de la variante se vuelve crítica para formular resultados clínicamente interpretables. La importancia clínica de una variante genética puede ser difícil de interpretar, asimismo, las pruebas moleculares pueden aumentar la complejidad de confirmar un diagnóstico si la naturaleza de la variante no está clara (Ameratunga *et al.*, 2010). La forma de realizar este análisis terciario depende de su finalidad sea para investigación o

diagnóstico; pero generalmente se siguen lineamientos y guías establecidas por el Colegio Americano de Genética y Genómica (ACMG) (Chinn *et al.*, 2019).

4.4 Clasificación de variantes

El ACMG ha desarrollado directrices para la determinación de la patogenicidad de variantes identificadas por medio de pruebas genéticas. En general, la clasificación de variantes se produce sobre la base de varios tipos de evidencia, incluidos los datos poblacionales recopilados, pruebas funcionales, datos biológicos previamente descritos, datos de distribución alélica y datos computacionales de predicción basados en variantes. (Chinn *et al.*, 2019). A partir de estas evidencias es posible clasificar las variantes en patogénicas, probablemente patogénicas, variantes de significado incierto, probablemente benignas y benignas (Richardson *et al.*, 2018).

Tabla 3.

Herramientas disponibles para la clasificación de variantes genéticas

Herramientas	Evidencia	Ejemplos
Bases de datos poblacionales	Las pautas para la clasificación de variantes incluyen la frecuencia de la población con criterios patogénicos aplicables si una variante está ausente o presente con una frecuencia baja en la población (<5%) y los criterios benignos son aplicables para las variantes observadas en un alelo con > 5.0% de frecuencia.	<i>Exome Sequencing Project (ESP), 1000 Genomes Project Consortium, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Genome Aggregation Database (gnomAD)</i>
Herramientas de predicción <i>in silico</i>	Las pautas para la clasificación de variantes utilizan evidencia computacional para predecir el impacto, dependiendo de la conservación evolutiva del nucleótido, la ubicación dentro de la proteína y la consecuencia bioquímica de la sustitución de aminoácidos. Estas herramientas para variantes de cambio sentido predicen el impacto potencial en la función de la proteína.	<i>Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT), PolyPhen-2 y MutationTaster</i>
Bases de datos de enfermedades, genes y variantes específicas	Las bases de datos específicas de enfermedades contienen información sobre la enfermedad y/o variantes identificadas en individuos con la enfermedad. Algunas bases de datos incluyen la clasificación de las variantes y la evidencia que lo respalda	<i>Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), ClinVar, Leiden Open Variation Database (LOVD) y Varsome.</i>

Nota: Adaptado de Lee y Abraham, 2021

CAPÍTULO 5

5. Inmunodeficiencias primarias en pacientes pediátricos en el Hospital Nacional de Niños

El estudio de inmunodeficiencias primarias en Costa Rica, por años, ha sido liderado por investigadores del Hospital de Nacional de Niños, gran cantidad de pacientes han sido estudiados y diagnosticados con defectos innatos en su sistema inmune en este centro. Además, en la última década el gran auge de las técnicas moleculares, y su aplicación en este centro, ha permitido realizar un diagnóstico más certero en muchos de los casos.

A partir de los reportes de LASID de los últimos años (Padilla, Rosales y Argumedo, 2013; Condino-Neto *et al.*, 2015; Abolhassani *et al.*, 2020), así como la experiencia brindada por el servicio de Inmunología/Reumatología y el laboratorio de Inmunología y Diagnóstico Molecular del Hospital Nacional de Niños, en el presente trabajo se abordaron y profundizaron cuatro inmunodeficiencias primarias que engloban la mayor cantidad de casos diagnosticados en este centro: la inmunodeficiencia combinada severa (SCID); la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X y el síndrome de hiper IgM, ambos comprendidos dentro del espectro de inmunodeficiencias humorales; y la Ataxia Telangiectasia que forma parte de las inmunodeficiencias sindrómicas.

5.1 Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)

Las inmunodeficiencias combinadas severas abarcan un heterogéneo grupo de desórdenes causados por defectos o ausencia de linfocitos T, con o sin ausencia de linfocitos B y células NK; la mayoría por variaciones genéticas subyacentes, que generan alteraciones en la inmunidad celular y humoral adaptativa (Picard, Moshous y Fischer, 2015)

La incidencia de SCID varía de 1 por cada 40 000 a 75 000 nacimientos (Kumrah *et al.*, 2020). A pesar de tener una apariencia saludable al nacimiento, conforme la inmunidad otorgada por la madre va disminuyendo, graves infecciones de diversos microorganismos pueden surgir en estos pacientes. Este grupo de padecimientos pertenece a las formas más graves de inmunodeficiencias primarias, con un alto grado de mortalidad si no es tratada a tiempo (Cirillo *et al.*, 2015).

Durante el primer año de vida de los pacientes con SCID se pueden presentar manifestaciones clínicas asociadas al defecto propio del sistema inmune. Entre las presentaciones más comunes se encuentra el bajo peso, falla para progresar, infecciones sinopulmonares y gastrointestinales, e incluso casos de enfermedad de injerto contra huésped debido a la presencia de linfocitos maternos circulantes, así como infecciones por microorganismos oportunistas como *Pneumocystis jirovecii* y *Candida* sp. Además, el examen físico puede revelar la ausencia de tejido linfoide y de timo.

Existen distintas formas de clasificar este padecimiento. De acuerdo al Consorcio de Tratamiento de Inmunodeficiencias Primarias, se puede clasificar como SCID típica o atípica (Griffith *et al.*, 2016). La SCID típica se caracteriza por un número inferior a 300 células/ μ L de linfocitos T con poca o nula función de esta célula. Además, se caracteriza por la presencia de linfocitos T maternos circulantes. Por otro lado, la SCID atípica, referida por algunos autores de manera coloquial como “*Leaky SCID*”, se describe con un reducido número de linfocitos T circulantes, pero mayor a 300 células/ μ L, además en estos casos se documenta una disminución de al menos el 30% de linfoproliferación en ensayos con fitohemaglutinina y ausencia de injerto materno (Stiehm y Sullivan, 2020). Otra variante del SCID es el síndrome de Ommen con un fenotipo distinto de los otros SCID, está caracterizado por eritroderma generalizada, presencia de desregulación de células T activadas e infiltración en distintos órganos, eosinofilia e hipogamaglobulinemia pero con altos niveles de IgE (Del Monte, Schuetz y Notarangelo, 2018).

La forma más convencional de catalogar estos trastornos es por el fenotipo inmunológico relacionado. En primera instancia se clasifica según la presencia de linfocitos B en el paciente (T^- , B^- o T^- , B^+) y una subclasificación basándose en la presencia o ausencia de las células NK (Cirillo *et al.*, 2015). Con base en esta clasificación, hasta hace unos años se orientaba el estudio molecular hacia una alteración genética determinada, lo cual permitía inferir en donde se produce el bloqueo en las diferentes etapas del proceso de diferenciación de la inmunidad celular. No obstante, con las técnicas moleculares más modernas se han identificado variantes genéticas que producen fenotipos clínicos e inmunológicos muy peculiares, por lo que la clasificación tradicional no siempre permite inferir el genotipo.

A lo largo de los años, pero especialmente en la última década, múltiples alteraciones en distintos genes se han identificado como causantes de SCID. Estos

desórdenes se han asociado a variantes en genes que codifican por receptores de citoquinas, moléculas clave en la recombinación V(D)J, necesaria para dar especificidad al receptor del célula T (TCR) y B (BCR); enzimas asociadas al metabolismo celular, reparación de ADN, entre otros (Picard, Moshous y Fischer, 2015).

Asimismo, se han identificado variantes en los mismos genes que producen fenotipos típicos o atípicos de SCID. La mayoría de las variantes atípicas de SCID se deben a mutaciones hipomórficas, que en contraste con las mutaciones nulas, codifican por proteínas con función residual que resultan, en algunos casos, en un fenotipo menos severo (Routes *et al.*, 2014).

A la fecha y según la última actualización de la IUIS en 2020, existen 20 genes descritos asociados a la inmunodeficiencia combinada severa, con distintos patrones de herencia (Tangye *et al.*, 2020) como se detalla en la tabla 4.

En el caso de Costa Rica, el último reporte oficial SCID data del 2013, donde se reportaron 28 casos diagnosticados de SCID entre 1980 y 2011. La mitad de los casos diagnosticados eran niñas y había consanguineidad en un 17,9% de las familias. La edad promedio de diagnóstico para estos pacientes fue de 3,7 meses. Los hallazgos clínicos más frecuentes en este grupo fueron candidiasis oral, diarrea crónica, bronconeumonías, citopenias y falla para progresar (Padilla, Rosales y Argumedo, 2013).

Tabla 4

Genes asociados a la inmunodeficiencia combinada severa

Enfermedad	Gen afectado	Herencia	Inmunofenotipo más común	OMIM¹
Deficiencia de la cadena común gamma delta	<i>IL2RG</i>	Ligada al X	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁻)	#300400
Deficiencia de JAK3	<i>JAK3</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁻)	#600173
Deficiencia de IL7R α	<i>IL7Rα</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁺)	#146661
Deficiencia de CD45	<i>PTPRC</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁺)	#151460
Deficiencia de CD3 δ	<i>CD3D</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁺)	#186790
Deficiencia de CD3 ϵ	<i>CD3E</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁺)	#186830
Deficiencia de CD3 ξ	<i>CD3Z</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁺ , NK ⁺)	#186780
Deficiencia de coronina 1-A	<i>CORO1A</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#605000
Deficiencia de LAT	<i>LAT</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#602354
Deficiencia de RAG	<i>RAG 1, RAG2</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#179615, #179616
Deficiencia de DCLREIC (Artemis)	<i>DCLREIC</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#605988
Deficiencia de DNA PKes	<i>PRKDC</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#615966
Deficiencia de Cernunnos/XLF	<i>NHEJ1</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#611290
Deficiencia de ADN ligasa IV	<i>LIG4</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁺)	#601837
Deficiencia de Adenosina deaminasa	<i>ADA</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁻)	#608958
Defecto en AK2	<i>AK2</i>	Autosómica recesiva	(T ⁻ , B ⁻ , NK ⁻)	#103020
Defecto en RAC2	<i>RAC2</i>	AD GOF		#602049

Nota: Adaptado de Tangye, S *et al.*, (2020). ¹OMIM: Online Mendelian Inherited in Men.

En Costa Rica se han identificado variantes patogénicas en tres de los genes antes mencionados. Los detalles en relación con las alteraciones así como los tipos de variantes mayormente identificadas en los genes asociados se especifican a continuación:

5.1.1 Inmunodeficiencia combinada ligada al X (OMIM #300400)

Es una de las formas más comunes de SCID, alrededor del 50% de los casos se debe a esta alteración. Es causada por mutaciones en el gen *IL2RG*; localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq13.1). Este gen, constituido por 8 exones, codifica por la cadena gamma común (γ_c) del receptor de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, e IL-21.

Esta proteína cumple un papel crítico como correceptor de las interleuquinas antes mencionadas. A raíz de la cascada de señalización que desencadenan, activan moléculas que son esenciales para la diferenciación y el crecimiento de las células T y NK, de ahí el perfil inmunológico anormal y el profundo defecto en la maduración de dichas células (Kumrah *et al.*, 2020).

El dominio extracelular de la proteína está codificado en los exones 1 al 5. En el exón 5 se encuentra el motivo altamente conservado WSXWS (rico en cisteína, triptófano y serina), esencial en el plegamiento apropiado de la proteína y por ende necesario para un adecuado transporte intracelular y unión al receptor. Por otro lado, el exón 6 codifica por la porción transmembrana de la proteína y los exones 7 y 8 por la región intracelular que se asocia con la tirosinkinasa JAK3 (Lim *et al.*, 2019).

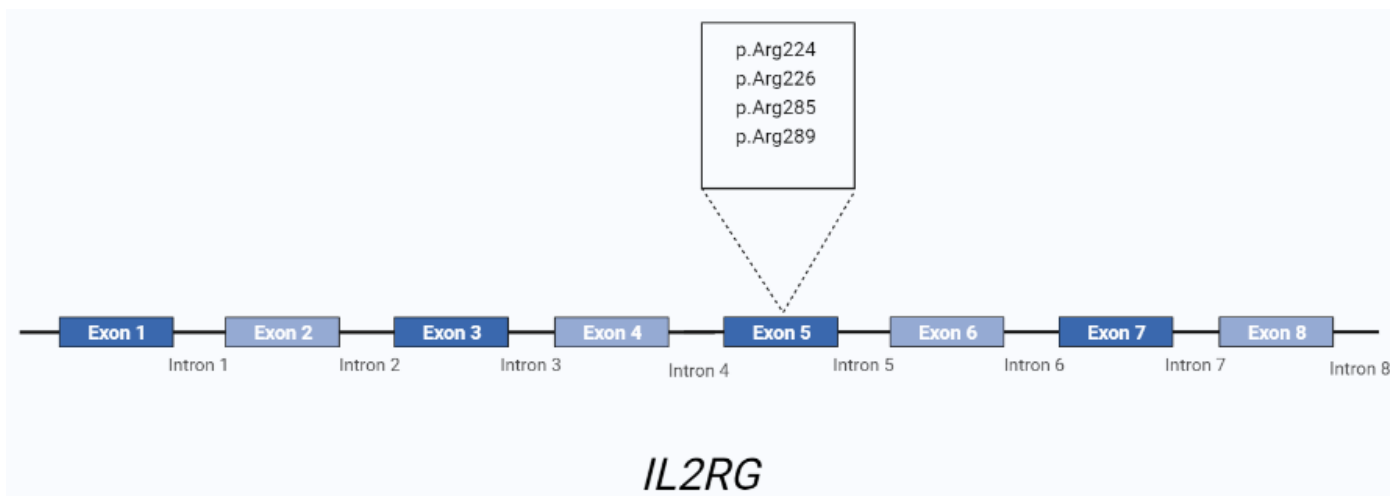


Figura 3. Elaboración propia, información adaptada de Allenspach, Rawlings y Scharenberg (2016). Estructura del gen *IL2RG* y puntos calientes mutacionales descritos.

Más de 200 variantes patogénicas, que abarcan los ocho exones del gen, han sido identificadas. Principalmente, cambios de un solo nucleótido (cambios de sentido o sin sentido), pequeñas inserciones, deleciones y cambios en sitios de empalme (*splicing*). Los puntos calientes mutacionales o “*hot spots*” en *IL2RG* se han descrito en los codones enp.Arg224, p.Arg226, p.Arg285 y p.Arg289 localizados en el exón 5 (Allenspach, Rawlings y Scharenberg, 2016). Alrededor de un 29,4% de las variantes en el gen se encuentran localizadas en el exón 5, mientras que un 19,9% se detectan en el exón 3 (Stiehm y Sullivan, 2020).

5.1.2 Deficiencia de Adenosina Deaminasa (OMIM #102700)

Es causada por variantes patogénicas en el gen *ADA*; localizado en el brazo largo del cromosoma 20 (20q12-q13.1). Este gen, constituido por 12 exones, codifica por la enzima adenosina deaminasa (ADA) fundamental en el metabolismo de las purinas. (Stiehm y Sullivan, 2020) Esta enzima se localiza en el citoplasma de los eritrocitos y linfocitos, y tiene la función de catalizar la deaminación de la adenosina y deoxiadenosina en el catabolismo de las purinas. En las células linfoides, ADA cumple una función desintoxicante esencial, al eliminar la deoxiadenosina (dAdo) para prevenir la expansión del grupo de deoxiadenosina trifosfato (dATP), que interfiere con la replicación del ADN y promueve la apoptosis (Hershfield, 2019).

A la fecha, existen 153 variables patogénicas o probablemente patogénicas reportadas en la base de datos ClinVar, de las cuales la mayoría son variantes de cambio de sentido, cambio de marco de lectura o cambios sin sentido (ClinVar, 2021).

Gran parte de estas variantes se han reportado en los exones 4, 5 y 7, regiones que codifican por el sitio activo y catalítico de la enzima. Asimismo, dependiendo de la variante así va a ser el efecto deletéreo sobre la proteína o la actividad enzimática de la misma (Kalman *et al.*, 2004). Alrededor de la mitad de los pacientes que presentan inmunodeficiencia presentan ausencia total de la actividad enzimática de ADA, mientras que variantes que resultan en una baja o moderada actividad residual (menos del 6% de

actividad) también han sido descritas en estos pacientes. Por otro lado, pacientes con variantes que resultan en al menos un 10% de actividad enzimática se han identificado como individuos saludables (Stiehm y Sullivan, 2020).

En general, la deficiencia de ADA puede generar un espectro fenotípico variable y existe una correlación entre el genotipo y fenotipo generado y por ende varias clasificaciones clínicas como SCID de inicio temprano, de inicio tardío y deficiencia parcial de ADA (Hershfield, 2019).

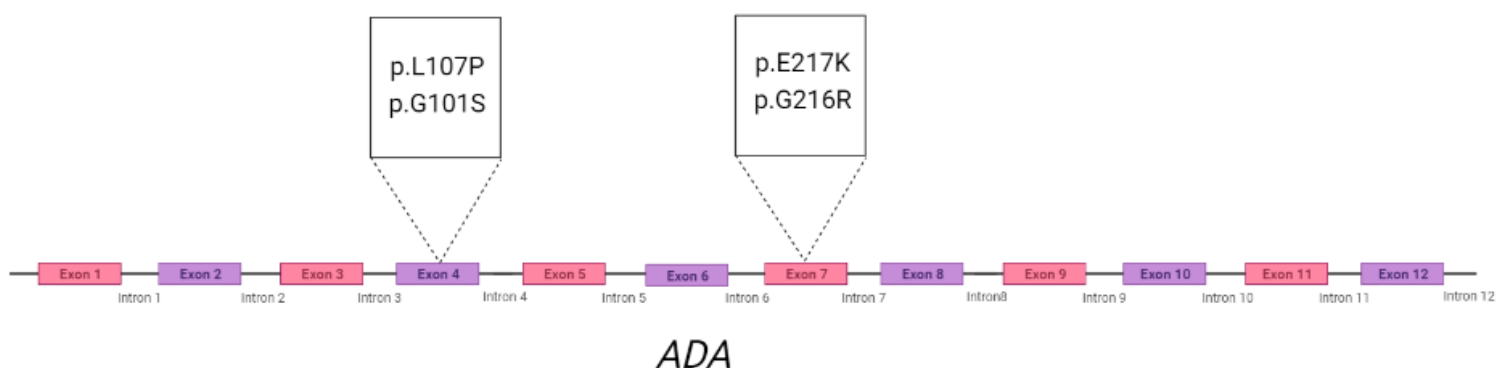


Figura 4. Elaboración propia, información adaptada de Stiehm y Sullivan (2020). Estructura del gen ADA y puntos calientes mutacionales descritos.

Múltiples variantes de han asociado a la inmunodeficiencia combinada severa de inicio temprano. Algunos de los “hot spots” descritos incluyen p.G20R, p.E217K y p.G216R, ubicados en sitios críticos de la molécula (Stiehm y Sullivan, 2020). Por lo general, los pacientes con este fenotipo son clínica e inmunológicamente indistinguibles de pacientes con otras formas de SCID clásica (Kumrah *et al.*, 2020).

Por otro lado, múltiples variaciones en sitios de *splicing* y la variante en p.R211C se han asociado con la forma de inicio tardío de SCID con alteraciones más leves de la función inmune. En estos casos las anomalías inmunológicas son menos pronunciadas que en la SCID y el diagnóstico suele ocurrir entre los 2 y 10 años de edad; estos casos se suelen catalogar como *leaky* SCID (Hershfield, 2019).

5.1.3 Disgenesia Reticular(OMIM #103020)

Esta patología se desarrolla en presencia de variantes patogénicas en el gen AK2, localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p35), constituido por 9 exones. Este gen

codifica por la enzima adenilato quinasa 2 (AK2) localizada en la mitocondria de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea; y es responsable de la fosforilación reversible entre nucleótidos trifosfatos y monofosfatos. La presencia de variantes patogénicas en esta enzima genera un arresto en la diferenciación de la línea mieloide y linfoide (Hoenig *et al.*, 2018).

La Disgenesia Reticular corresponde a un 2% del total de los casos de SCID. Tiene la particularidad de que los pacientes con esta alteración presentan una severa linfopenia y neutropenia que los deja indefensos ante las infecciones por microorganismos oportunistas (Cirillo *et al.*, 2015) presentan, además, sordera neurosensorial. A la fecha, existen 60 variantes patogénicas o probablemente patogénicas reportadas en la base de datos ClinVar (ClinVar, 2021). Los tipos de variantes abarcan cambios de un solo nucleótido (con sentido y sin sentido), así como deleciones a pequeña y gran escala.

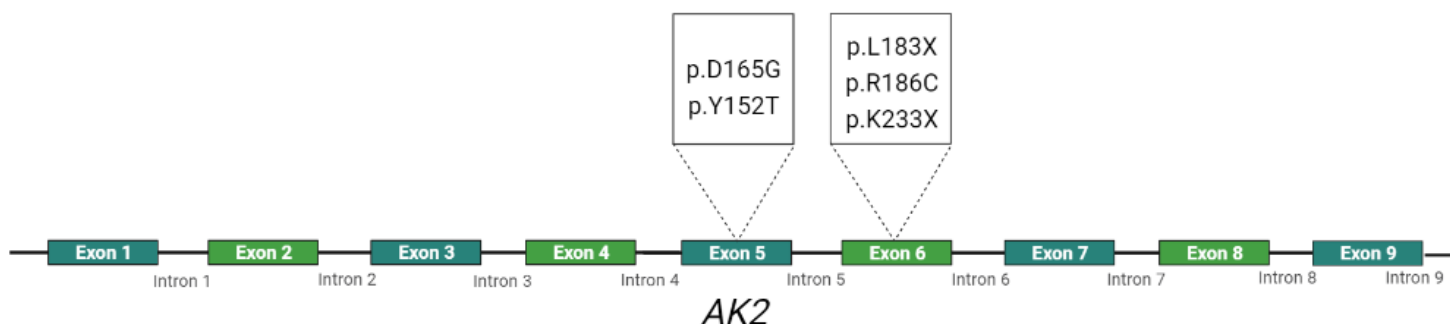


Figura 5. Elaboración propia, información adaptada de ClinVar (2021). Estructura del gen AK2 y algunas de sus variantes patogénicas descritas.

Todas las variantes sin sentido, además de las que afectan el codón de inicio, afectan residuos que muestran un alto grado de conservación filogenética y que generan un impacto en la actividad y función de la enzima (Hoenig *et al.*, 2018).

5.2 Inmunodeficiencias humorales

Los defectos en la célula B son muy heterogéneos siendo así que, de acuerdo al punto en el desarrollo afectado, será el fenotipo expresado. Por consiguiente, se puede dar un amplio espectro de manifestaciones: desde la ausencia total de linfocitos B e inmunoglobulinas, conocido como agammaglobulinemia, una deficiencia parcial de

linfocitos B e inmunoglobulinas, o una deficiencia selectiva de anticuerpos con los demás isotipos de inmunoglobulinas normales (Smith y Cunningham-Rundles, 2019).

Las alteraciones que generan estos fenotipos pueden darse en distintos niveles de diferenciación, por ejemplo: en el receptor de la célula pre B (pre BCR), en proteínas de señalización corriente debajo de la cascada de señalización como la tirosin quinasa de Bruton (BTK) o la proteína enlazadora de células B (BLNK) que provocan un arresto en el desarrollo en el estadio pre B. Por otro lado, defectos en proteínas reguladoras de supervivencia como el receptor del activador de células B (BAFF-R) y la proteína 11 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD11) interrumpen la maduración y la diferenciación de células B transicionales a células B de zona marginal y foliculares (Pieper, Grimbacher y Eiber, 2013).

Mientras que variantes en la señalización de TLR, correceptores antigénicos como CD19 o en enzimas responsables en la recombinación y cambio de clase de las inmunoglobulinas afectan las subpoblaciones maduras como las células de memoria y plasmáticas (Pieper, Grimbacher y Eiber, 2013).

Los defectos en la célula B a menudo se distinguen de otras inmunodeficiencias por la edad de inicio de la enfermedad, usualmente después de los 6 meses hasta el primer año de vida cuando la protección otorgada por la madre se va aclarando, se destacan por la severidad y el tipo de infecciones que presentan, frecuentemente por bacterias encapsuladas y en tracto respiratorio y gastrointestinal (Smith y Cunningham-Rundles, 2019).

Se pueden observar parámetros de laboratorio específicos alterados, como la disminución o ausencia de inmunoglobulinas séricas y ausencia de respuesta humoral después de retos vacunales (Aghamohamadi, *et al.*, 2009).

5.2.1 Agammaglobulinemia

Se reportan aproximadamente 1 de cada 100 000 a 200 000 casos dependiendo de la etnia y el defecto genético específico. La herencia de la enfermedad se asocia con una genética tanto recesiva como ligada al X (Smith y Cunningham-Rundles, 2019). A la fecha y según la última actualización de la IUIS en 2020, existen 12 genes descritos asociados a agammaglobulinemia como se observa en la tabla 5, siendo el gen *BTK* el responsable de la mayoría de los casos (Tangye *et al.*, 2020).

Tabla 5

Genes asociados a la agammaglobulinemia

Enfermedad	Gen	Herencia	Frecuencia	OMIM
Deficiencia de BTK	<i>BTK</i>	Ligado al X	85%	#300300
Deficiencia de la cadena pesada mu	<i>IGHM</i>	Autosómica recesiva	10%	#147020
Deficiencia de $\lambda 5$	<i>IGLL1</i>	Autosómica recesiva	<1%	#146770
Deficiencia de Ig α	<i>CD79A</i>	Autosómica recesiva	<1%	#112205
Deficiencia de Ig β	<i>CD79B</i>	Autosómica recesiva	<1%	#147245
Deficiencia de BLNK	<i>BLNK</i>	Autosómica recesiva	<1%	#604515
Deficiencia de p110 δ	<i>PIK3CD</i>	Autosómica recesiva	<1%	#602839
Deficiencia de p85	<i>PIK3R1</i>	Autosómica recesiva	<1%	#615214
Deficiencia del factor de transcripción E47	<i>TCF3</i>	Autosómica recesiva	<1%	#616941
Deficiencia del factor de transcripción E47	<i>TCF3</i>	Autosómica dominante	<1%	#147141
Deficiencia de ZIP7	<i>SLC39A7</i>	Autosómica recesiva	<1%	#601416
Síndrome de Hoffman	<i>TOP2B</i>	Autosómica dominante	<1%	#126431

Nota: Adaptado de Tangye, S. *et al.*, (2020) y Stiehm, ER. y Sullivan K. (2020)

En Costa Rica se han identificado variantes patogénicas en el gen *BTK* responsable de la agammaglobulinemia ligada al X. Los detalles en relación con la alteración, así como los tipos de variantes mayormente identificadas en el gen se especifican a continuación:

5.2.1.1 Agamaglobulinemia ligada al X (OMIM #300300)

Es causada por variantes en el gen *BTK*; localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq20). Este gen está constituido por 19 exones, de los cuales 18 codifican por la tirosin quinasa de Bruton (BTK) (Stiehm y Sullivan, 2020). Esta proteína forma parte de la familia de tirosin quinasa citoplasmáticas Tec y es expresada en todos los estadios madurativos de la línea B, excepto en las células plasmáticas.

La característica principal de esta afección es la ausencia de células B circulantes, con presencia de células pro B y pre B en médula ósea, lo que indica un bloqueo en este punto específico de la maduración de la línea celular (Smith y Cunningham-Rundles, 2019).

La tirosin quinasa de Bruton es primordial en la señalización corriente abajo del receptor de células pre-B (pre BCR) y el receptor de células B (BCR), para continuar la maduración celular; el entrecruzamiento del pre BCR recluta la proteína BTK, que a su vez activa a las proteínas adaptadoras y, posteriormente, a la fosfolipasa C- γ . La fosfolipasa C- γ activada induce la proteína quinasa activada por mitógenos, que activa factores de transcripción importantes en el desarrollo celular.

Como resultado del arresto madurativo menos del 2% de linfocitos B pueden llegar a circular y los niveles de inmunoglobulinas son casi indetectables para todos los isotipos, generando una respuesta humoral prácticamente inexistente. Una deficiencia en esta proteína conlleva una disminución de los nódulos linfáticos y las amígdalas, usualmente pobladas por linfocitos B (Stiehm y Sullivan, 2020). Estos pacientes presentan un conteo y funcionalidad adecuados de células T.

La proteína BTK consiste en 5 dominios estructurales constituidos por el N-terminal, el dominio de homología de plekstrina (PH) con una extensión de 120 aminoácidos; el dominio de homología Tec (TH) de aproximadamente 60 residuos; ambos codificados entre el exón 2 y 8 del gen. El dominio 3 de homología Src (SH3) con 60 residuos aproximadamente codificado entre el exón 8 y el exón 9; el dominio 2 de homología Src (SH2) con 100 aminoácidos aproximadamente, se encuentra codificado del exón 10 al exón 12 y el dominio catalítico de quinasa de 280 residuos que se encuentra codificado del exón 13 al 19. La proteína en total tiene una extensión de 659 aminoácidos (Väliäho, Smith y Vihinen, 2006; Conley y Parolino, 1994).

Se han reportado más de 300 variantes patogénicas en los 5 dominios de gen *BTK* causantes del XLA (Varsome, 2020). Dos tercios de las variantes patogénicas provocan codones prematuros de parada, defectos en los sitios de *splicing* o cambios en los marcos de lectura. Además, aproximadamente un tercio de estas variantes generan sustituciones de aminoácidos (Ci, Smith y Bergl, 2020). Asimismo, varios autores han reportado variantes patogénicas intrónicas profundas (Kralovicova *et al.*, 2011; Mohiuddin *et al.*, 2013).

La mayoría de las variantes reportadas son de cambio de sentido, sin sentido y deleciones. Las variantes se han reportado de manera casi uniforme a través de la proteína, no obstante muchas de las variantes de cambio de sentido que generan la enfermedad se encuentran dentro de los dominios PH, SH2 y quinasa. Se ha visto que se suelen afectar los sitios CpG que generan residuos de arginina, el aminoácido con más variantes reportadas en este gen, un tercio de las sustituciones de aminoácidos reportadas reemplazan la arginina, un cuarto de estas sustituciones generan codones de terminación. Los dinucleótidos CpG, que están contenidos en cuatro de los seis codones de la arginina (R487, R520, R525 y R544), son puntos calientes mutacionales o “*hot spots*” (Väliaho, Smith y Vihinen, 2006).

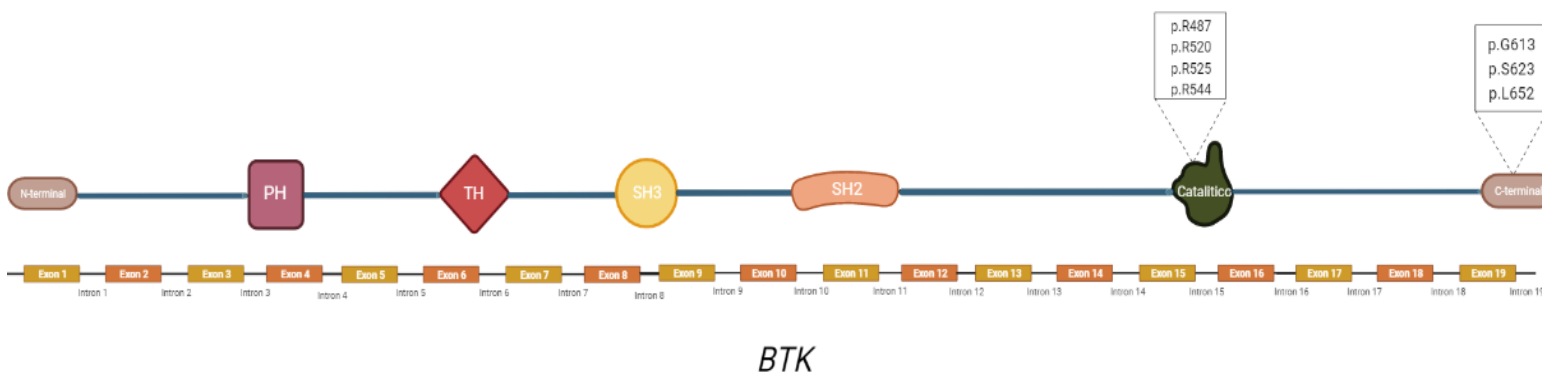


Figura 6. Elaboración propia, información adaptada de Väliaho, Smith y Vihinen (2006). Estructura del gen y dominios de *BTK* y sitios calientes mutacionales descritos.

Se han descrito al menos 18 residuos importantes tanto a nivel estructural como funcional de la proteína: L408, G411, Q412, M450, H454, R487, E513, R520, R525 (este residuo se encuentra en el motivo específico de PTK y tiene un papel importante en el reconocimiento del sustrato y la unión de ATP), S543, R544, D549, K558, F574, S575, N603, G613, S623 y L652 (variantes en este residuo rompen hélices α en el dominio C

terminal). Además las variantes F540S, D521H, R525Q, V626G, F644S y C502W se confirmaron experimentalmente en variaciones que inactivan BTK (Väliaho *et al.*, 2015)

Ahora bien, en cuanto a la relación fenotipo-genotipo existe una heterogeneidad considerable en la clínica y el curso de los pacientes con XLA, además, globalmente no existe una fuerte correlación genotipo-fenotipo establecida. Sin embargo, se ha demostrado que mutaciones específicas en BTK pueden influir en la gravedad de la enfermedad (Teimourian, *et al.*, 2008).

5.2.2 Defectos de recombinación por cambio de clase (Síndrome Hiper IgM)

Los defectos de recombinación por cambio de clase de inmunoglobulina (CSR, por sus siglas en inglés) son inmunodeficiencias primarias raras, con una frecuencia de alrededor de 1 de cada 500 000 nacimientos. Se definen por la presencia de niveles de IgM en suero elevado o normal y niveles séricos bajos o nulos de los isotipos cambiados (IgG, IgA e IgE), de ahí el nombre anterior de la afección "Síndrome de hiper-IgM" (Stiehm y Sullivan, 2020). Se han descrito formas de herencia recesiva, dominante y ligada al cromosoma X de la enfermedad.

Por otro lado, variantes en genes involucrados en la señalización de células B, cambio de isotipo de inmunoglobulinas, hipermutación somática y mecanismos de reparación del ADN se han visto implicadas en la presentación del fenotipo "hiper IgM" siendo *CD40LG* el gen responsable del 70% de los casos (Yazdani *et al.*, 2019). Los más importantes se destacan en la tabla 6.

Tabla 6

Genes asociados a los defectos de recombinación por cambio de clase de inmunoglobulina

Enfermedad	Gen	Herencia	Frecuencia	OMIM
Deficiencia de CD40 ligando	<i>CD40LG</i>	Ligado al X	70%	#300386
Deficiencia de CD40	<i>CD40</i>	Autosómica recesiva	<1%	#109535
Deficiencia de AID	<i>AICDA</i>	Autosómica recesiva/dominante	20%	#605258/#605257
Deficiencia de UNG	<i>UNG</i>	Autosómica recesiva	<1%	#191525
Deficiencia de NFκβ1	<i>NFKB1</i>	Autosómica recesiva	<1%	#164011
Deficiencia de INO80	<i>INO80</i>	Autosómica recesiva	<1%	#610169
Deficiencia de ATM	<i>ATM</i>	Autosómica recesiva	<1%	#208900
Deficiencia de PMS2	<i>PMS2</i>	Autosómica recesiva	<1%	#600259
Deficiencia de MSH6	<i>MSH6</i>	Autosómica recesiva	<1%	#600678
Deficiencia de MSH2	<i>MSH2</i>	Autosómica recesiva	<1%	#609309
Deficiencia de RAG2	<i>RAG2</i>	Autosómica recesiva	<1%	#179616
Síndrome de fosfatidil inositol 3 quinasa activado (APDS)	<i>PIK3R1</i>	Autosómica recesiva/dominante	<1%	#171833
APDS	<i>PIK3CD</i>	Autosómica recesiva/dominante	<1%	#602839
Deficiencia de ICOS	<i>ICOS</i>	Autosómica recesiva	<1%	#604558

Nota: Adaptado de Tangye, S. *et al.*, (2020), Stiehm, ER. y Sullivan K., (2020) y Yazdani R *et al.*, (2019)

La mayoría de las formas autosómicas de síndrome hiper IgM se presentan como una IDP humoral típica; sin embargo, las formas ligadas al cromosoma X y autosómicas dominantes muestran un espectro de manifestaciones clínicas similares a los trastornos de inmunodeficiencia combinada (Yazdani *et al.*, 2019).

Las formas genéticas clásicas de los síndromes se clasifican, según OMIM, como tipos de hiper IgM del 1 al 5 de la siguiente manera: tipo 1 (OMIM # 308230) describe al hiper IgM ligado al X consecuencia de variantes patogénicas en *CD40LG*, tipo 2 (OMIM # 605258) refiere al hiper IgM dado por variantes patogénicas autosómicas recesivas o dominantes en el gen *AICDA*, tipo 3 (OMIM # 606843) dado por variantes patogénicas autosómicas recesivas en el gen *CD40* (Online Mendelian Inheritance Man, 2015).

Por otro lado, el hiper IgM tipo 4 (OMIM # 608184), dado como consecuencia de un defecto selectivo en genes que codifican por factores específicos para la recombinación y cambio de isotipo, de la maquinaria de reparación del ADN o en las señales de supervivencia enviadas a las células B que pasaron por el proceso de hipermutación somática y el tipo 5 (OMIM # 608106) dado por variantes patogénicas autosómicas recesivas o dominantes en el gen *UNG* (Online Mendelian Inheritance in Man, 2015).

En Costa Rica se han identificado variantes patogénicas en tres de los genes mencionados en la tabla 6, *CD40LG* responsable del hiper IgM ligada al X, *AICDA* y *PIK3CD*. Los detalles en relación con las alteraciones, así como los tipos de variantes mayormente identificadas en los genes se especifican a continuación:

5.2.2.1 Deficiencia de CD40 ligando (OMIM #300386)

Es causada por variantes en el gen *CD40LG*; localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq26.3). Este gen está constituido por 5 exones, que codifican por la proteína ligando de CD40 (CD40L) también conocido como CD154 (Stiehm y Sullivan, 2020). Esta proteína de 261 aminoácidos es expresada en células T CD4+ activadas. El CD40L es una proteína transmembrana tipo II, miembro de la familia TNF con 3 dominios asociados: el intracelular, transmembrana y el extracelular (Cabral-Marques *et al.*, 2014).

El CD40L se une a su receptor CD40, que se expresa constitutivamente en los linfocitos B, lo que permite que se produzca el cambio de isotipo de inmunoglobulina. Una interacción deficiente o nula entre CD40L/CD40 previene la formación de centros

germinales en los folículos linfoides y por consiguiente, el cambio de clase. Además, genera una hipermutación somática deficiente (De la Morena, 2016).

Al mismo tiempo, CD40L se une a CD40 en otras células inmunes como macrófagos y células dendríticas, lo que permite su activación. La interacción CD40L/CD40 es requerida para una respuesta celular completamente activada. En los monocitos esta interacción promueve la producción de citoquinas proinflamatorias (Stiehm y Sullivan, 2020).

La unión de CD40L-CD40 también permite la activación, posterior al reconocimiento de antígenos, por parte de las células T y contribuye a una respuesta eficaz en dichas células. Por ende, las variantes patogénicas en *CD40LG* puedan dar como resultado un fenotipo clínico de inmunodeficiencia combinada (De la Morena, 2016).

Más de la mitad de todos los pacientes con Hiper IgM ligado al X desarrollan neutropenia. El análisis de la médula ósea revela un bloqueo en la etapa de promielocitos a mielocitos en estos pacientes, no obstante, el mecanismo por el cual ocurre lo anterior no está completamente dilucidado. Sin embargo, la activación de CD40 de las células del estroma de la médula ósea regula al alza la expresión de dos reguladores clave de la granulopoyesis: el factor estimulante de colonias de granulocíticas/ monocíticas (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocíticas (G-CSF), lo que podría explicar el conteo disminuido de neutrófilos (Stiehm y Sullivan, 2020).

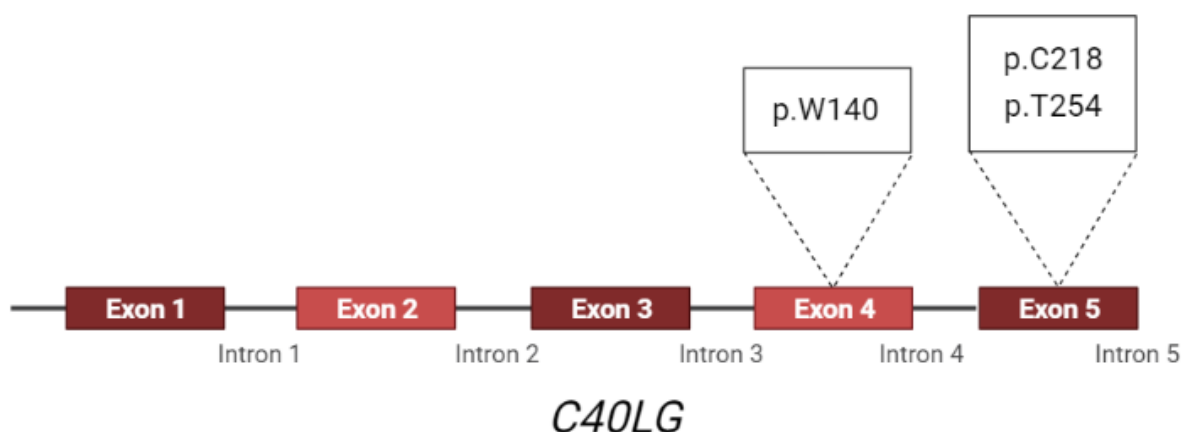


Figura 7. Elaboración propia, información adaptada de Stiehm y Sullivan (2020). Estructura del gen *CD40LG* y sitios calientes mutacionales descritos.

Las variantes patogénicas observadas, hasta la fecha, están distribuidas por todo el gen *CD40L*, pero tienden a concentrarse en el exón 5 y 4 que codifican por el dominio extracelular de la proteína, y que además, comparte el mayor grado de homología con el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Stiehm y Sullivan, 2020).

Se han reportado más de 100 variantes patogénicas, incluidas sustituciones de un solo nucleótido, truncamientos, deleciones en marco o fuera de marco de lectura, variantes sin sentido, con cambio de sentido, y del sitio de empalme (*splicing*) entre pacientes con hiper IgM ligada al X. Como se mencionó, estas mutaciones afectan principalmente el dominio extracelular, resultando en un plegamiento defectuoso de CD40L o previniendo la unión de CD40L con CD40 (Yazdani *et al.*, 2019). Algunos de los puntos calientes mutacionales reportados son W140 (Tsai, *et al.*, 2015), IVS1+1 g>t, IVS3+1g>a/t, IVS4+1 g>c. C218, y T254 (Wang *et al.*, 2014).

5.2.2.2 Deficiencia de CD40 (OMIM #109535)

Es causada por variantes en el gen *CD40*; localizado en el brazo largo del cromosoma 20 (20q12-q13.12). Este gen está constituido por 9 exones que codifican por la proteína CD40 (Stiehm y Sullivan, 2020). La proteína es miembro de la superfamilia de receptores de TNF (Factor de Necrosis Tumoral). CD40 es un receptor de las células presentadoras de antígenos, por lo tanto, se expresa en células B, monocitos, células dendríticas, células endoteliales y células epiteliales; es esencial para mediar respuestas inmunitarias e inflamatorias, incluido el cambio de clase de inmunoglobulina dependiente de células T, el desarrollo de células B de memoria y la formación de centros germinales en los folículos linfoides (Piiirilä, Väliäho y Vihinen, 2006).

La unión de CD40 con su ligando induce la expresión de la enzima AID, crucial para el cambio de isotipo y maduración de la afinidad. Por consiguiente, en estos casos la respuesta humoral a antígenos proteicos es dominada por anticuerpos de tipo IgM “*unswitched*”, es decir, generados por células B extrafoliculares sin procesos de hipermutación somática, seguido por cantidades muy limitadas de los otros isotipos (Yazdani *et al.*, 2019).

A la fecha existen pocos casos descritos en la literatura afectados con la deficiencia de CD40 autosómica recesiva, representa menos de un 1% de los casos de hiper IgM. Estos

pacientes exhiben el mismo fenotipo grave que los pacientes con deficiencia de CD40L, sin embargo, en este caso es la célula B la que no responden al estímulo de CD40L. Se han reportado algunas variantes patogénicas que están asociadas a un mal plegamiento de la proteína lo que provoca que quede atrapada en el retículo endoplásmico (De la Morena, 2016).

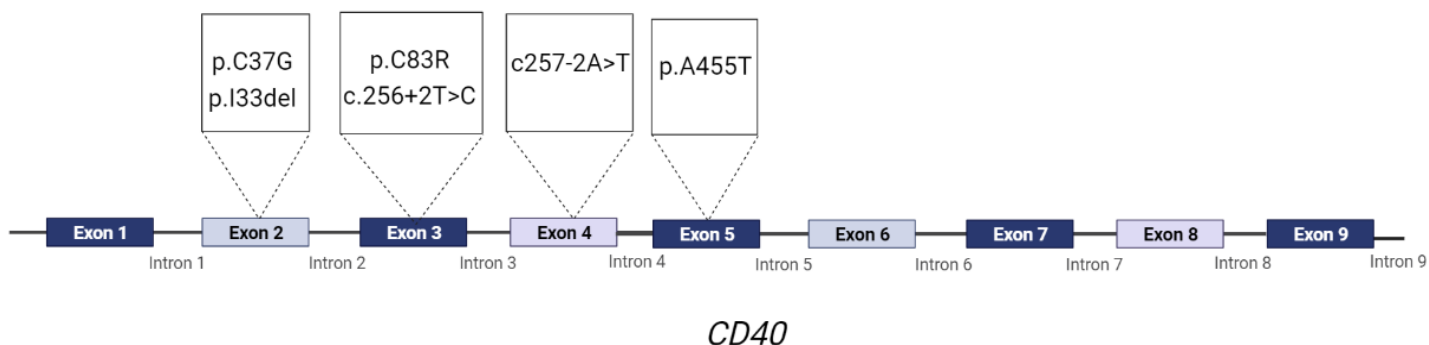


Figura 8. Elaboración propia, información adaptada de Varsome (2020). Estructura del gen *CD40* y variantes patogénicas descritas.

Existen 6 variantes patogénicas descritas en la base de datos Varsome, a lo largo de todo el gen *CD40*, 3 variantes son de cambio de sentido, una de cambio de marco de lectura, 2 variantes en sitios de empalme y una de pérdida de codón de terminación, localizadas en el exón 2, 3, 4 y 5 (Varsome, 2020). No existen descritos “puntos calientes” mutacionales aún para este gen. Las variantes se detallan en la imagen 8.

5.2.2.3 Deficiencia de Citidina deaminasa activada inducida (AID) (OMIM #605257/605258)

Es causada por variantes en el gen *AICDA*; localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.31). Este gen está constituido por 5 exones, que codifican por la proteína AID y se expresa únicamente en los linfocitos B de centro germinal (Piiirilä, Väliaho y Vihinen, 2006). Se han reportado casos debido a variantes recesivas y dominantes. La forma autosómica recesiva representa alrededor del 20% de los casos de defectos de recombinación de cambio de clase y es el segundo más frecuente después de CD40L (Stiehm y Sullivan, 2020).

La AID tiene como función generar desoxiuracilos al desaminar la desoxicitosina en las regiones de cambio en los genes de la cadena pesada de inmunoglobulina, durante la recombinación de cambio de clase. Posteriormente, la enzima UNG elimina los desoxiuracilos del ADN, generados para provocar las roturas de la doble cadena durante el cambio de isotipo de Ig, para posteriormente iniciar la vía de reparación del ADN (Yazdani *et al.*, 2019).

La deficiencia de AID por variantes bialélicas es caracterizada por niveles de IgM en suero normales o elevados con ausencia de IgG, IgA e IgE, lo que resulta en una profunda susceptibilidad a las infecciones bacterianas. Hay una ausencia de recombinación para el cambio de clase de inmunoglobulinas, una deficiencia en el proceso de hipermutación somática y una hiperplasia de los ganglios linfáticos causada por la presencia de centros germinales gigantes (Piirilä, Väliaho y Vihinen, 2006).

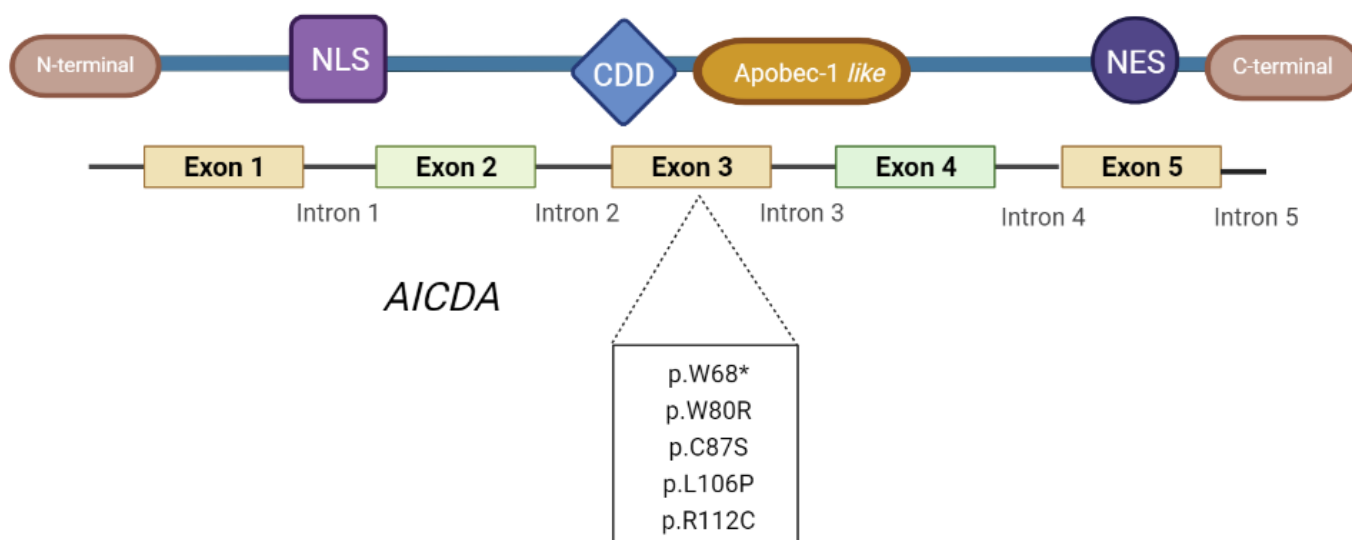


Figura 9. Elaboración propia, información adaptada de Varsome (2020). Estructura del gen, dominios y variantes patogénicas descritas de *AICDA*.

El gen que codifica la AID está conformado por los dominios: NLS (del inglés *Nuclear localization signal*), el dominio citidina deaminasa, el dominio similar a Apobec-1 y el dominio NES (del inglés *Nuclear export signal*) (Cabral-Marques *et al.*, 2014). Hasta la fecha se han reportado mayoritariamente variantes que provocan codones de terminación prematuros y deleciones, principalmente a nivel del exón 3. Se han reportado variantes

homocigóticas de *AICDA*, responsables de la aparición autosómica recesiva. No se han reportado sitios calientes mutacionales en este gen (Durandy *et al.*, 2007).

Sin embargo, en el caso de las variantes heterocigotas en el gen *AICDA*, en los pacientes con Hiper IgM heredado de forma autosómica dominante, se ha encontrado que la hipermutación somática no se ve afectada (Yazdani *et al.*, 2019). Particularmente, se ha reportado que las variantes ubicadas en el dominio C terminal de AID (variaciones en el sitio de empalme del intrón 4) conducen a una deficiencia de cambio de isotipo severa, mientras que la hipermutación somática no se ve alterada (Stiehm y Sullivan, 2020).

5.2.2.4 Deficiencia de PIK3CD(OMIM #602839)

Es causada por variantes en el gen *PIK3CD*; localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.22). Este gen está constituido por 22 exones, que codifican por la subunidad p110 δ de la enzima PI3K δ y se expresa en leucocitos (Crank *et al.*, 2014). Las fosfatidil inositol 3 quinasas (PI3K) son una familia de enzimas que participan en funciones celulares como el crecimiento, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Las PI3K constan de tres clases diferentes: PI3K α , PI3K β y PI3K δ . Cada clase de PI3K consta de 3 subunidades catalíticas y 5 subunidades reguladoras (Yazdani *et al.*, 2019).

La enzima PI3K δ consta de las subunidades catalíticas p110 α , p110 β y p110 δ codificadas por *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PIK3CD* respectivamente y las subunidades reguladoras p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 γ . Se expresa en leucocitos y es activada por la interacción CD40 / CD40L directamente o mediante la GTPasa RAC, lo que aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno y controla la expresión de CD40 (Crank *et al.*, 2014).

Recientemente, variantes heterocigóticas con herencia autosómica dominante, de ganancia de función y que afectan principalmente a los dominios C2 y quinasa, en los genes que codifican por la subunidad catalítica p110 δ y reguladora p85 α se han descrito como responsables, respectivamente, del síndrome de PI3K-delta activado (APDS) y Síndrome SHORT. Ambos se han asociado con el fenotipo hiper IgM (Yazdani *et al.*, 2019).

Los pacientes con APDS se describen con anomalías del compartimento de células B que consisten en linfopenia leve de células B con aumento de células B de transición,

disminución de células B de memoria y defectos de recombinación de cambio de clase. Se han informado niveles elevados de IgM en la mayoría de los pacientes, mientras que los niveles totales de IgG e IgA pueden ser normales o marcadamente disminuidos (Jamee *et al.*, 2020).

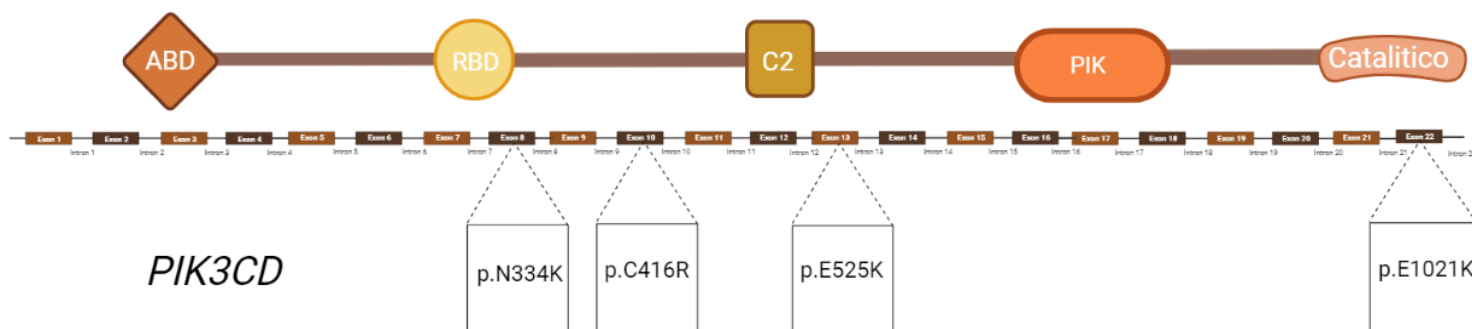


Figura 10. Elaboración propia, información adaptada de Varsome (2020). Estructura del gen y dominios de *PIK3CD* y variantes patogénicas descritas.

A la fecha se han reportado en las bases de datos Varsome, ClinVar y UniProt, 20 variantes patogénicas de las cuales 19 son variantes de cambio de sentido y 1 variante sin sentido (Varsome, 2020). Las variantes N334K, C416R, E525K E1021K son las más comúnmente reportadas como causantes de ganancia de función de p110 δ , la subunidad catalítica de PI3K δ (Stiehm y Sullivan, 2020).

5.3 Ataxia Telangiectasia (OMIM #208900)

Esta patología se desarrolla en presencia de variantes patogénicas en el gen *ATM*, localizado en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22-23), está constituido por 66 exones y codifica por la proteína ATM (ataxia telangiectasia mutado). Dicha proteína se reporta de forma ubicua en la mayoría de órganos humanos y tipos de células (detectado principalmente en el nucleoplasma) (Amirinfar *et al.*, 2019).

El gen *ATM* codifica por una protein quinasa de serina/treonina que pertenece a la familia de las fosfatidilinositol 3-4 quinatas (Amirinfar *et al.*, 2019). ATM activa la señalización del punto de control sobre roturas de doble hebra, apoptosis y tensiones genotóxicas como la radiación ionizante; actuando así como un sensor de daño del ADN.

Generalmente, un evento temprano durante la respuesta al daño del ADN es la monomerización y activación de ATM, que conduce a la fosforilación rápida de varias proteínas involucradas en la reparación del ADN, el punto de control del ciclo celular y la transcripción (Amirinfar *et al.*, 2019).

La ataxia-telangiectasia (A-T) es una enfermedad autosómica recesiva, que se manifiesta con neurodegeneración progresiva, inmunodeficiencia, telangiectasias, alto riesgo de cáncer y envejecimiento prematuro. Específicamente, es caracterizada por ataxia cerebelosa, lesiones telangiectásicas en distintas regiones de la anatomía, inmunodeficiencia, niveles séricos de IgG e IgA disminuidos y una alta predisposición a malignidades por hipersensibilidad a la radiación ionizante (Stiehm y Sullivan, 2020).

La enfermedad se manifiesta más claramente entre los 3 y 5 años de edad, con dificultad para aprender a caminar y quienes ya caminan tienen tropiezos y caídas frecuentes; posteriormente, se manifiestan las telangiectasias. El cuadro es progresivo en cuanto al deterioro neurológico, llegando a postrar en cama al paciente en el inicio de la adolescencia o requerir una silla de ruedas para su desplazamiento. La muerte se presenta principalmente por complicaciones infecciosas broncopulmonares (Torres-Flores, 2011).

Existen reportes de alta frecuencia de A-T en algunos países y se han asociado con efectos fundadores. En América Latina, la A-T representa el 8,7% de las IDPs registradas. Por otro lado, en Costa Rica, la ataxia telangiectasia es la inmunodeficiencia primaria más prevalente del país (0,93 / 100.000 habitantes). El estudio de Matus y Porras (2011) registró a lo largo de 10 años, 75 casos de A-T, para una incidencia de 13.2 casos por 100.000 habitantes. En el estudio de Telatar *et al.* (1998) se reportó la existencia de un efecto fundador en Costa Rica al estudiar 27 familias no relacionadas, con casos de A-T. En la publicación se identificaron 4 variantes distintas que englobaban el 86% de los casos. Las variantes se denominaron CRAT (Costa Rica Ataxia Telangiectasia) A, B, C y D.

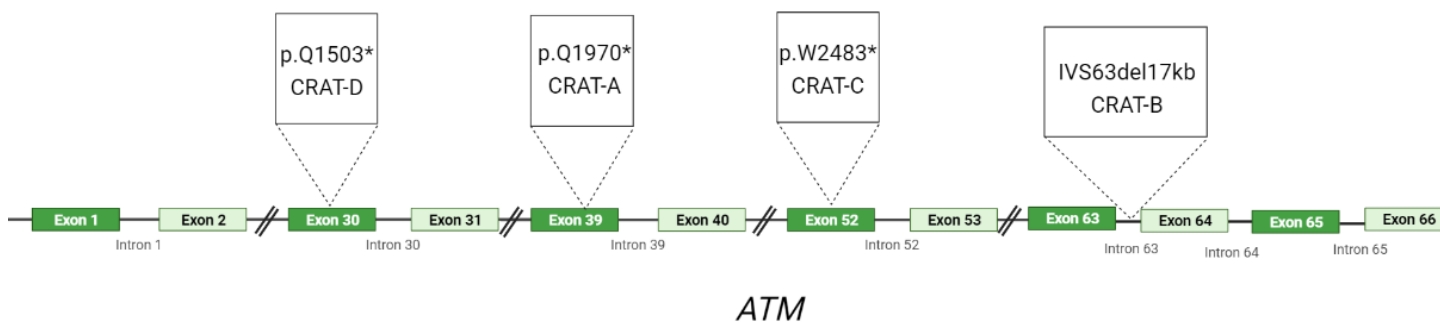


Figura 11. Elaboración propia, información adaptada de Telatar *et al.* (1998). Estructura del gen *ATM* y variantes patogénicas con efecto fundador en Costa Rica.

La variante CRAT-A se encuentra en el exón 39, es un cambio de nucleótido de una citosina por una timina (c.5908C>T) que crea una señal de terminación prematura en el codón 1970 (p.Gln1970*), por lo tanto, resulta en un producto proteico ausente o interrumpido. Esta variante se encontró en un 56% de los participantes y es la más común entre los pacientes con A-T (Telatar *et al.*, 1998).

Por otra parte, la variante CRAT-B es una gran delección de un segmento 17 kb que va desde la región L1 del intrón 63 y termina más allá de la región 3' UT (IVS63del17kb). Esta variante se encontró en un 7,4% de los participantes (Telatar *et al.*, 1998).

En cuanto a la variante CRAT-C se encuentra en el exón 52 y es un cambio de nucleótido de una guanina por una adenina (c.7449G>A) esta variante crea un sitio aceptor de *splicing* falso de modo que los últimos 70 nucleótidos del exón 52 son eliminados, iniciando en el codón 2483 (p. Trp2483*), por lo tanto, resulta en un producto proteico truncado. Esta variante se encontró en un 13% de los participantes (Telatar *et al.*, 1998).

Asimismo, respecto a la variante CRAT-D esta se encuentra en el exón 30 y es una sustitución de citosina por timina en la posición 4507, (c.4507C>T); esto da como resultado un codón de terminación (p.Gln1503*). Esta variante se encontró en un 9,3% de los participantes (Telatar *et al.*, 1998).

Existen a la fecha 1712 variantes patogénicas reportadas en total en las bases de datos ClinVar, UniProt y Varsome (Varsome, 2020) El espectro de variantes en *ATM* incluye variantes en sitios de empalme, variantes sin sentido que causan codones de terminación prematuros y variantes de cambios de marco de lectura (Stiehm y Sullivan, 2020).

CAPÍTULO 6

6.1 Estrategias terapéuticas disponibles en inmunodeficiencias primarias

Históricamente los pacientes con errores innatos de la inmunidad han tenido a disposición una cantidad limitada de alternativas terapéuticas, entre ellas se destacan: el reemplazo de inmunoglobulinas, los esteroides, profilaxis antibiótica y el trasplante de médula ósea.

- Gammaglobulina intravenosa

La terapia de reemplazo de inmunoglobulina (Ig) es el estándar de oro para el tratamiento de muchas IDPs que afectan la producción de anticuerpos (Canessa, 2019) y fundamental en el soporte de inmunodeficiencias combinadas; además, en los últimos años, su uso se ha expandido para incluir otros trastornos autoinmunitarios e inflamatorios (Sriaroon y Ballow, 2015).

Las gammaglobulinas inespecíficas humanas están compuestas de IgG (más del 95%) y pequeñas cantidades de IgM e IgA y se derivan de grandes *pools* de plasma de miles de donantes. La terapia con gammaglobulina se administra con el fin de prevenir infecciones bacterianas graves y complicaciones a largo plazo relacionadas con dichas infecciones, especialmente afecciones pulmonares, en pacientes con deficiencias inmunes (Reula y De Arriba, 2019). Particularmente, en pacientes con deficiencias significativas de anticuerpos como agammaglobulinemia e inmunodeficiencia común variable, la IgG de reemplazo previene eficazmente la neumonía e infecciones severas. (Sriaroon y Ballow, 2015).

La gammaglobulina se puede administrar por vía subcutánea o intravenosa. La selección de la vía de administración debe basarse dependiendo de cada caso individual, el estado clínico del paciente y otros factores (Sriaroon y Ballow, 2015). Dado que el reemplazo de IgG de por vida es la única terapia disponible para la mayoría de los pacientes con deficiencias humorales, los clínicos deben realizar un historial completo e identificar factores de riesgo antes de desarrollar un régimen de tratamiento (Sriaroon y Ballow, 2015).

Ahora bien, a pesar de cumplir con la prevención de complicaciones en estos pacientes, aproximadamente un tercio de los pacientes que reciben inmunoglobulina intravenosa (IgIV) experimentan efectos adversos sistémicos durante o dentro de las 72 horas posteriores a las infusiones. Algunas de las manifestaciones pueden incluir fiebre,

escalofríos, fatiga, malestar general, escalofríos, anorexia, dolor musculo esquelético, mialgia, artralgia, hinchazón de las articulaciones, síntomas similares a los de la gripe, reacciones anafilactoides o hipotermia (Sriaroon y Ballow, 2015). No obstante, la mayoría de las reacciones son benignas y se pueden manejar fácilmente, sin embargo, algunas reacciones pueden ser más graves o provocar complicaciones a largo plazo.

- Profilaxis antibiótica

Las infecciones invasivas bacterianas, fúngicas, virales y micobacterianas conllevan una alta morbilidad y mortalidad en los pacientes inmunodeprimidos, debido a esto se ha dirigido un enorme esfuerzo a su prevención. El uso de antibióticos, como terapia primaria o adjunta, ha sido crítico para la supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias en el último siglo (Marciano y Holland, 2017).

La profilaxis antibiótica ha transformado el desenlace clínico de muchas inmunodeficiencias primarias como en la enfermedad granulomatosa crónica, deficiencias de complemento, susceptibilidad mendeliana a micobacterias, el síndrome de Wiskott-Aldrich, hiper-IgE. Además, ha sido un herramienta indispensable para la prevención de *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con deficiencias de células T. Asimismo, en el caso de las inmunodeficiencias primarias de anticuerpos, si bien la terapia de reemplazo con gammaglobulina es primordial para el pronóstico de estos pacientes, las infecciones siguen siendo un problema frecuente al que se enfrentan (Marciano y Holland, 2017).

Se ha observado que el daño estructural crónico en los pulmones que sufren los pacientes con deficiencias humorales contribuyen a la recurrencia y persistencia de infecciones del tracto respiratorio, a pesar del uso de gammaglobulina intravenosa. Aunque no existen guías publicadas para el manejo de pacientes con deficiencia de anticuerpos y bronquiectasias, el uso de profilaxis antibiótica es una práctica común. Las terapias con antibióticos únicos o combinados y administrados de manera intermitente se utilizan ampliamente en estos casos (Kuruvilla y Morena, 2013).

No obstante, una preocupación constante con el uso a largo plazo de antibióticos es la aparición de patógenos emergentes y más virulentos, así como el aumento de la resistencia a los antimicrobianos entre la microbiota de las vías respiratorias. Por lo tanto, los pacientes que reciben tal terapia deben ser monitoreados de cerca, y la terapia debe suspenderse en ausencia de una mejoría manifiesta (Kuruvilla y Morena, 2013).

- Trasplante de médula ósea (TMO)

El TMO como opción terapéutica para inmunodeficiencias primarias representa una alternativa primordial para lograr la restitución inmune en muchos pacientes. Obtener un injerto robusto de células madre del donante en el receptor y la corrección del defecto inmunológico subyacente suele ser el objetivo final del TMO. Asimismo, el TMO exitoso logra prolongar y aumenta la calidad de vida de los pacientes con IDP al disminuir drásticamente sus diversas complicaciones (Shamriz, 2019).

Ahora bien, antes de considerar el TMO como una opción viable es importante considerar ciertos aspectos fundamentales, tal como la inmunodeficiencia primaria que afecta al paciente y propiamente los compartimentos celulares afectados. Las IDPs por defectos en el compartimento linfohematopoyético son las candidatas ideales para dicho abordaje. El TMO es la primera opción en algunos casos de SCID, ciertos síndromes bien definidos como el Wiskott-Aldrich y en los defectos de la fagocitosis (Abolhassani *et al.*, 2019).

Por otro lado, es poco probable que las anomalías inmunitarias debido a defectos en la barrera epitelial tímica estromal o gastrointestinal se corrijan mediante un TMO. Los defectos a nivel de complemento también son un ejemplo de inmunodeficiencias que no corrigen tras un trasplante de médula ósea, pues muchos factores así como sus proteínas reguladoras son sintetizados a nivel hepático (Shamriz, 2019).

Además, es importante tomar en cuenta el estado de la enfermedad en el paciente. Un control agresivo de infecciones, presencia de autoinmunidad, hiperinflamación y la optimización del nivel sérico de IgG mediante el reemplazo de inmunoglobulinas son clave (Shamriz, 2019). El pronóstico es mejor en pacientes libres de infección y cuando el trasplante se realiza lo antes posible, pues se ha demostrado que pacientes de IDP trasplantados antes de los 3 meses de edad comparados con pacientes mayores tienen mejores resultados (Abolhassani *et al.*, 2019).

Conjuntamente, el grado de histocompatibilidad también influye, siendo más idóneos los idénticos. El trasplante puede ser de donante idéntico emparentado, donante idéntico no emparentado y haploidéntico emparentado (Reula y De Arriba, 2019).

6.2 Otras alternativas terapéuticas según el diagnóstico genético

En la era moderna, con el avance en técnicas diagnósticas y terapéuticas, el manejo de pacientes con inmunodeficiencias primarias se presenta con gran cantidad de retos y oportunidades para la comunidad clínica. A raíz de lo anterior, surge un nuevo concepto en el campo de las IDPs, la medicina de precisión. Bajo este concepto se busca desarrollar nuevas terapias para promover el manejo óptimo y específico de acuerdo a cada alteración en pacientes con inmunodeficiencia primaria (Leiding y Ballow, 2018).

Por lo tanto, una ventaja importante del uso de pruebas genéticas en las IDP es la capacidad de personalizar la terapia para un paciente en función de su forma genética particular de enfermedad (Heimall, 2019). Debido a esto, han surgido alternativas muy novedosas para algunas inmunodeficiencias primarias, por ejemplo la terapia génica, la implantación tímica y las terapias inmunomoduladoras; dentro de las que se incluyen el reemplazo enzimático, la terapia de citoquinas e inhibidores de moléculas de señalización (Vignesh y Rawat, 2016; Abraham y Butte, 2021).

- Terapia génica

El tratamiento de los trastornos hereditarios reemplazando o corrigiendo genes defectuosos en las células somáticas de un paciente, se ha convertido en un objetivo de la biomedicina durante al menos medio siglo, este tratamiento conocido como terapia génica es una metodología que aborda la inserción de material genético en un individuo para tratar una enfermedad ya sea de forma directa (*in vivo*) o indirectamente, a través del uso de células como vehículo de liberación (*ex vivo*) (Kuo y Kohn, 2021).

La terapia génica es una herramienta que se ha implementado recientemente con éxito para tratar ciertas inmunodeficiencias primarias, principalmente en aquellos casos en que los pacientes carecen de un donante adecuado para realizar un TMO o con ciertas complicaciones que impiden dicha alternativa (Cicalese y Aiuti, 2015).

Se han realizado ensayos clínicos utilizando la terapia génica de manera exitosa para tratar 6 inmunodeficiencias primarias: SCID por deficiencia de ADA (Aiuti, Roncarolo y Naldini, 2017; Shaw *et al.*, 2017), ARTEMIS (Punwani *et al.*, 2017) y ligada al X (Mamcarz *et al.*, 2019); Wiskott-Aldrich (Morris *et al.*, 2017), deficiencia de adhesión leucocitaria tipo 1 (Almartza *et al.*, 2019) y Enfermedad Granulomatosa Crónica ligada al X (Kohn *et al.*, 2020; Cicalese y Aiuti, 2015).

Sin embargo, en algunos casos, la eficacia de la terapia génica se ha contrarrestado por la aparición de oncogénesis insercional. Asimismo, la terapia génica no es una opción viable en muchos países en vías de desarrollo por sus costos elevados y complejidad (Cicalese y Aiuti, 2015). No obstante, hasta la fecha, más de 150 pacientes con diversas formas de IDPs han sido tratados en todo el mundo mediante la terapia génica autóloga. Estudios más recientes con tecnologías de vectores refinadas han demostrado excelentes perfiles de seguridad y evidencia convincente del beneficio clínico en varias enfermedades (Thrasher y Williams, 2017).

De la misma forma, un segundo enfoque importante de la terapia génica ha ido surgiendo y es la aplicación de la edición dirigida al gen endógeno, en lugar de adición de un gen exógeno con un vector viral; aprovechando las vías naturales de reparación del ADN de las células. Esta modificación del genoma específico se facilita al inducir un corte doble en las cadenas de ADN cerca de las secuencias que se van a editar (Kuo y Kohn, 2021). Una serie de "enzimas de diseño" que son endonucleasas específicas del sitio han sido desarrolladas para la edición génica, incluidas las nucleasas con dedos de zinc, las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción y la proteína asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas 9 (*CRISPR-Cas9*, por sus siglas en inglés). Se está desarrollando la edición de genes para muchas formas de IDPs, incluida la SCID ligada al X, por deficiencia de ADA, el Síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X, la agammaglobulinemia ligada al X, la linfocitosis hereditaria; entre otros (Kuo y Kohn, 2021).

- Reemplazo enzimático

La terapia de reemplazo enzimático como alternativa terapéutica para tratamiento de SCID dada por deficiencia de ADA se ha descrito ampliamente y es una opción para pacientes en los que no se puede realizar un TMO ni terapia génica. El reemplazo enzimático se lleva a cabo por medio del uso de ADA bovina modificada con polietilenglicol (PEG-ADA) (Arrieta-Bolaños, 2010). La restauración de las funciones inmunitarias tiende a producirse entre 2 y 4 meses después del inicio del tratamiento.

Se ha observado que el reemplazo enzimático logra reducir significativamente las tasas de infección y la probabilidad de supervivencia a 20 años, después de la terapia puede llegar a ser de alrededor del 78% (Vignesh y Rawat, 2016). Sin embargo, los altos costos

incurridos por el tratamiento con PEG-ADA son una barrera enorme para mantener la terapia a largo plazo en los países en desarrollo.

- Terapias inmunomoduladoras

Al identificarse los mecanismos moleculares detallados de varias IDPs se abre la posibilidad de realizar ensayos clínicos utilizando agentes inmunomoduladores como terapia de primera línea en diferentes IDPs. El uso de estos agentes modifica la inmunidad disminuyendo o aumentando una respuesta inflamatoria particular; por lo tanto, estos agentes tienen alcance para ser utilizados como terapias dirigidas (Vignesh y Rawat, 2016).

El uso de productos biológicos en la inmunodeficiencia está evolucionando rápidamente. Al determinar el mecanismo específico de la enfermedad, es posible un enfoque racional para la aplicación de estos tratamientos en la inmunodeficiencia primaria. Algunos ejemplos incluyen el bloqueo del receptor de IL-6 (tocilizumab) en el tratamiento de STAT3-Ganancia de función, CTLA-4 recombinante (abatacept) en el tratamiento de haploinsuficiencia de *CTLA-4* y deficiencia de *LRBA* o inhibición de la subunidad catalítica p110 δ (leniolisib) en el tratamiento de la disfunción inmunitaria mediada por PIK3CD-Ganancia de función (Heimall, 2019).

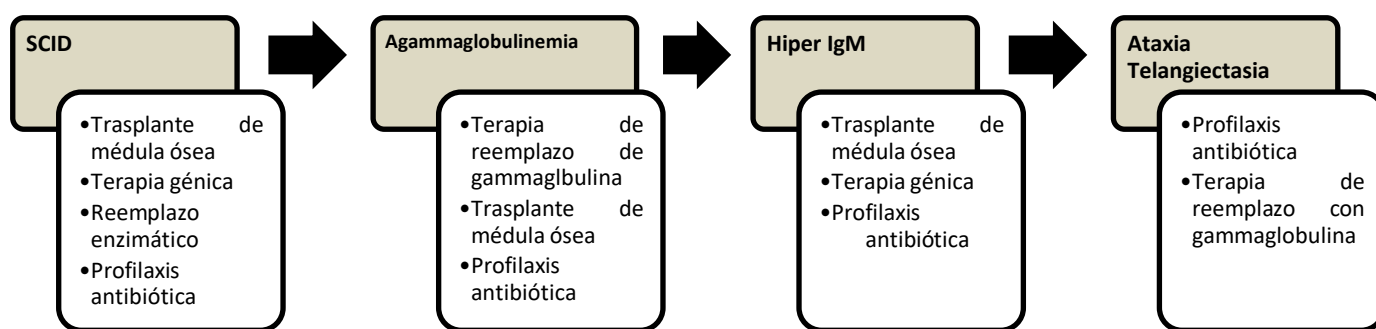


Figura 12. Opciones terapéuticas disponibles para las inmunodeficiencias descritas en el capítulo 2.

6.2 Implicaciones pronósticas del diagnóstico genético de inmunodeficiencias primarias

Existen algunos factores comunes que afectan el pronóstico general de un paciente con una inmunodeficiencia primaria. Algunos de ellos son: la edad al momento del diagnóstico, presencia de infecciones, presencia de complicaciones no infecciosas como enfermedad pulmonar, linfoproliferación, enfermedad granulomatosa o complicaciones autoinmunes, así como la edad en el momento del abordaje terapéutico definitivo seleccionado (Raje y Dinakar, 2015). Lo anterior puede contribuir en el desenlace y curso que tendrá determinada enfermedad en el paciente.

La genética también puede ayudar a pronosticar el resultado de la terapia de larga duración. Por ejemplo, en el caso de SCID, se ha tratado clásicamente con TMO, independientemente del fenotipo (o genotipo); sin embargo, existen claras diferencias en los efectos a largo plazo del TMO para SCID que se ven afectados por el genotipo, incluida la supervivencia, la durabilidad de la reconstitución inmune de las células T y la función de las células B (Heimall, 2019).

Se ha demostrado que los pacientes con SCID debido a defectos de RAG1 o RAG2 y de ADA tienen una peor reconstitución de células T después del TMO en ausencia de acondicionamiento previo al trasplante. Por otro lado, los pacientes con Artemis SCID tienen más probabilidades de tener retraso del crecimiento y otras toxicidades tardías con la exposición a regímenes de acondicionamiento basados en alquilantes. En comparación, los defectos del gen activador de la recombinasa (RAG) no parecen aumentar la susceptibilidad al daño del ADN después de la exposición a agentes alquilantes como el Busulfán y la radiación ionizante (Heimall, 2019).

Conclusiones

A pesar del significativo avance diagnóstico y terapéutico de la última década en el campo de las inmunodeficiencias primarias, es importante continuar suscitando la consciencia de la existencia de estas enfermedades mal llamadas enfermedades raras, pues se ha visto un incremento en la prevalencia de muchas de estas, sin embargo, siguen siendo numerosos los casos sub diagnosticados o con diagnóstico tardío.

La población en general, médicos y colaboradores de la salud deben estar informados acerca de este tipo de padecimientos. Es fundamental que el personal clínico de todos los niveles esté capacitado en inmunología básica y clínica para lograr reconocer los signos clásicos de estas entidades y levantar la sospecha clínica de manera temprana. Lo anterior, represente un reto permanente en este campo.

Las implicaciones que puede tener el diagnóstico genético pueden ser muy relevantes para lograr confirmar la etiología, y en ciertos casos, es incluso esencial para determinar y seleccionar el tratamiento adecuado.

No obstante, pueden existir casos en donde el diagnóstico molecular no permite dilucidar la causa, en estos casos no se deben dejar de lado los otros dos puntos esenciales en este campo: 1) la presentación clínica/fenotipo y 2) el diagnóstico inmunológico apoyado por pruebas que evalúan la función inmune. Este enfoque triple es primordial en muchos escenarios, para lograr un abordaje apropiado de los pacientes con inmunodeficiencias primarias.

Aún prevalecen grandes desafíos para el diagnóstico molecular, bajo el modelo “un gen:muchos fenotipos”, el ámbito molecular enfrenta un gran reto para determinar los defectos genéticos subyacentes, especialmente aquellos que presentan baja penetrancia genética, fenómenos de mosaicismo, modificadores epigenéticos, ambientales o ambos.

Asimismo, aplicar la medicina de precisión y los abordajes terapéuticos específicos y necesarios de una forma estándar y accesible para todos representa el reto más grande de todos hoy en día, especialmente para países en vías de desarrollo como Costa Rica.

Referencias

- Abolhassani, H., Rezaei, N., Mohammadinejad, P., Mirminachi, B., Hammarstrom, L., y Aghamohammadi, A. (2015). Important differences in the diagnostic spectrum of primary immunodeficiency in adults versus children. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11(2), 289–302. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.990440>
- Abolhassani, H., Azizi, G., Sharifi, L., Yazdani, R., Mohsenzadegan, M., Delavari, S., Aghamohammadi, A. (2020). Global systematic review of primary immunodeficiency registries. *Expert Review of Clinical Immunology*, 16(7), 717–732. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1801422>
- Abolhassani, H., Tavakol, M., Chavoshzadeh, Z., Mahdavian, S. A., Momen, T., Yazdani, R., Aghamohammadi, A. (2019). National Consensus on Diagnosis and Management Guidelines for Primary Immunodeficiency. *Immunology and Genetics Journal*, 2(1), 1–21. <https://doi.org/10.22034/IGJ.2019.85743>
- Abraham, R. S., y Butte, M. J. (2021). The New "Wholly Trinity" in the Diagnosis and Management of Inborn Errors of Immunity. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 9(2), 613–625. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.11.044>
- Abraham, R. S. (2011). Relevance of laboratory testing for the diagnosis of primary immunodeficiencies: A review of case-based examples of selected immunodeficiencies. *Clinical and Molecular Allergy*, 9, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-9-6>
- Aghamohammadi, A., Lougaris, V., Plebani, A., y Miyawaki, T. (2009). Predominantly Antibody Deficiencies. In *Primary immunodeficiencies* (pp. 98–129).
- Allenspach E, Rawlings DJ, Scharenberg AM. (2016) X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.

- Al-Herz, W., Chou, J., Delmonte, O. M., Massaad, M. J., Bainter, W., Castagnoli, R., Notarangelo, L. D. (2019). Comprehensive genetic results for primary immunodeficiency disorders in a highly consanguineous population. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03146>
- Almartza E, Mesa-Nunez C, Damian C, Fernandez-Garcia M, Diez-Cabezas B, Lozano L. (2019) Gene therapy for LAD-1 immunodeficiency: preclinical evaluation of HSC transduction under optimized GMP-conditions. *Blood*;134:5751.
- Amaya-Uribe, L., Rojas, M., Azizi, G., Anaya, J. M., y Gershwin, M. E. (2019). Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 99(January), 52–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.01.011>
- Ameratunga, R., Woon, S., Neas, K., y Love, D. R. (2010). The clinical utility of molecular diagnostic testing for primary immune deficiency disorders: a case based review. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-12>
- Amirifar, P., Ranjouri, M. R., Yazdani, R., Abolhassani, H., y Aghamohammadi, A. (2019). Ataxia-telangiectasia: A review of clinical features and molecular pathology. *Pediatric Allergy and Immunology*, 30(3), 277–288. <https://doi.org/10.1111/pai.13020>
- Aiuti A, Roncarolo MG, Naldini L. (2017) Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*;9:737-40.
- Arrieta-Bolaños, E. (2010) Avances en la etiología molecular y tratamiento de la inmunodeficiencia combinada severa (SCID). *Rev Biomédica* 21:35-47. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/131/143>
- Buckinham, L. (2019) *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. Editor F.A. Davis Company. Philadelphia. Pp 576.
- Bruton O. (1968) The discovery of agammaglobulinemia. In: Bergsma D, editor. *Immunologic deficiency diseases in man*. New York: The National Foundation; pp. 2–6.

- Canessa, C. A. (2019). Management of Humoral Primary Immunodeficiencies in Pediatrics. *Nature Switzerland*, 253–274. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91785-6>
- Cabral-Marques, O., Klaver, S., Schimke, L. F., Ascendino, É. H., Khan, T. A., Pereira, P. V. S., Condino-Neto, A. (2014). First report of the hyper-IgM syndrome registry of the latinamerican society for immunodeficiencies: Novel mutations, unique infections, and outcomes. *Journal of Clinical Immunology*, 34(2), 146–156. <https://doi.org/10.1007/s10875-013-9980-4>
- Cicalese, M. y Aiuti, A. (2015). Clinical applications of gene therapy for Primary Immunodeficiencies. *Human Gene Therapy*, 201(9), 44–45. <https://doi.org/doi:10.1089/hum.2015.047>.
- Ci, X. L. A., Smith, E., y Bergl, A. (2020). X-Linked Agammaglobulinemia Summary Suggestive Findings, 1–15.
- Cirillo, E., Giardino, G., Gallo, V., D’Assante, R., Grasso, F., Romano, R., Pignata, C. (2015). Severe combined immunodeficiency-An update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1356(1), 90–106. <https://doi.org/10.1111/nyas.12849>
- Chapel, H., Prevot, J., Gaspar, H. B., Español, T., Bonilla, F. A., Solis, L., Symes, A. (2014). Primary immune deficiencies - principles of care. *Frontiers in Immunology*, 5(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00627>
- Chinn, I. K., Chan, A. Y., Chen, K., Chou, J., Dorsey, M. J., Hajjar, J., Raje, N. (2019). Diagnostic interpretation of genetic studies in patients with primary immunodeficiency diseases: A working group report of the Primary Immunodeficiency Diseases Committee of the American Academy of Allergy Asthma Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(1), 46–69. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.009>
- ClinVar (2021) ADA OMIM #608958. National Center for Biotechnology Information NCBI. Tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/608958>. Accesado el 15 de marzo, 2021

- ClinVar (2021) AK2 OMIM #103020. National Center for Biotechnology Information NCBI. Tomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=ak2%5Bgene%5D>. Accesado el 17 de marzo, 2021
- Condino-Neto, A., y Espinosa-Rosales, F. J. (2018). Changing the lives of people with Primary Immunodeficiencies (PI) with early testing and diagnosis. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01439>
- Condino-Neto, A., Sorensen, R. U., Gómez Raccio, A. C., King, A., Espinosa-Rosales, F. J., y Franco, J. L. (2015). Current state and future perspectives of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID). *Allergologia et Immunopathologia*, 43(5), 493–497. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2014.05.007>
- Conley, M. E., Parolino, O. (1994). The Genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics*, 40, 319–324.
- Crank, M. C., Grossman, J. K., Moir, S., Pittaluga, S., Buckner, C. M., Kardava, L., Rosenzweig, S. D. (2014). Mutations in PIK3CD can cause hyper IgM syndrome (HIGM) associated with increased cancer susceptibility. *Journal of Clinical Immunology*, 34(3), 272–276. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0012-9>
- Del Monte, O. M., Schuetz, C., y Notarangelo, L. D. (2018). RAG Deficiency: Two Genes, Many Diseases. *Journal of Clinical Immunology*, 38(6), 646–655. <https://doi.org/10.1007/s10875-018-0537-4>
- De la Calle, V. G., Pérez, M., y Puig Morón, N. (2020). Inmunodeficiencias primarias. Congreso de actualización en Pediatría (Vol. 12). <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.10.010>
- De la Morena, M. T. (2016). Clinical Phenotypes of Hyper-IgM Syndromes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 4(6), 1023–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.09.013>
- Durandy, A., Taubenheim, N., Peron, S., y Fischer, A. (2007). Pathophysiology of B-Cell Intrinsic Immunoglobulin Class Switch Recombination Deficiencies. *Advances in Immunology*, 94(06), 275–306. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)94009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)94009-7)

- El-Sayed, Z. A., y Radwan, N. (2020). Newborn Screening for Primary Immunodeficiencies: The Gaps, Challenges, and Outlook for Developing Countries. *Frontiers in Immunology*, 10 (January), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02987>
- Griffith, L. M., Cowan, M. J., Notarangelo, L. D., Kohn, D. B., Puck, J. M., Shearer, W. T., Al, G. E. T. (2016). Workshop summary Primary Immune Deficiency Treatment Consortium (PIDTC) update, 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.051>
- Hadizadeh, H., Salehi, M., Khoramnejad, S., Vosoughi, K., y Rezaei, N. (2017). The association between parental consanguinity and primary immunodeficiency diseases: A systematic review and meta-analysis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 28(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/pai.12685>
- Heimall, J. (2019). Genetic Testing to Diagnose Primary Immunodeficiency Disorders and to Identify Targeted Therapy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 39(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.08.009>
- Herber, M., Mertz, P., Dieudonné, Y., Guffroy, B., Jung, S., Gies, V., Guffroy, A. (2020). Primary immunodeficiencies and lymphoma: a systematic review of literature. *Leukemia and Lymphoma*, 61(2), 274–284. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1672056>
- Hernández-Martínez, C., Espinosa-Rosales, F. J., Espinosa-Padilla, S. E., Hernández-Martínez, A. R., y Blancas-Galicia, L. (2016). Conceptos básicos de las inmunodeficiencias primarias. *Revista Alergia México*, 63(2), 180. <https://doi.org/10.29262/ram.v63i2.146>
- Hershfield, M. (2019). Adenosine Deaminase Deficiency Summary GeneReview Scope. *GeneReviews*, 1–21. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1483/>
- Hoening, M., Pannicke, U., Gaspar, H. B., y Schwarz, K. (2018). Recent advances in understanding the pathogenesis and management of reticular dysgenesis. *British Journal of Haematology*, 180(5), 644–653. <https://doi.org/10.1111/bjh.15045>

- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., y Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Jamee, M., Moniri, S., Zaki-Dizaji, M., Olbrich, P., Yazdani, R., Jadidi-Niaragh, F., Azizi, G. (2020). Clinical, Immunological, and Genetic Features in Patients with Activated PI3K δ Syndrome (APDS): a Systematic Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 59(3), 323–333. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08738-9>
- Jesenak, M., Banovcin, P., Jesenakova, B., y Babusikova, E. (2014) Pulmonary manifestations of primary immunodeficiency disorders in children. *Frontiers in Pediatrics*, 2(JUL), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00077>
- Kalman, L., Lindegren, M. Lou, Kobrynski, L., Vogt, R., Hannon, H., Howard, J. T., y Buckley, R. (2004). Mutations in genes required for T-cell development: IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, IMG1, IMG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency: HuGE review. *Genetics in Medicine*, 6(1), 16–26. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000105752.80592.A3>
- Kralovicova J, Hwang G, Asplund AC, Churbanov A, Smith CIE, Vorechovsky I. (2011) Compensatory signals associated with the activation of human GC 5' splice sites. *Nucleic Acids Res*; 39:7077–91.
- Kohn DB, Booth C, Kang EM, Pai SY, Shaw KL, Santilli G. (2020) Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nat Med*; 26:200-6.
- Kumrah, R., Vignesh, P., Patra, P., Singh, A., Anjani, G., Saini, P., Rawat, A. (2020). Genetics of severe combined immunodeficiency. *Genes and Diseases*, 7(1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.004>
- Kuo, C. Y., y Kohn, D. B. (2021). Clinical reviews in allergy and immunology Overview of the current status of gene therapy for primary immune deficiencies (PIDs). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(2), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.024>

- Kuruville, M., Teresa, M., y Morena, D. (2013). Antibiotic Prophylaxis in Primary Immune Deficiency Disorders. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice*, 1(6), 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.09.013>
- Lee, K., y Abraham, R. S. (2021) Next-generation sequencing for inborn errors of immunity. *Human Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.011>
- Leiding JW y Ballow M. (2018) Precision medicine in the treatment of primary immunodeficiency diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Apr;18(2):159-166. doi: 10.1097/ACI.0000000000000431. PMID: 29406361.
- Lim, C. K., Abolhassani, H., Appelberg, S. K., Sundin, M., y Hammarström, L. (2019). IL2RG hypomorphic mutation: Identification of a novel pathogenic mutation in exon 8 and a review of the literature. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0317-y>
- Locke, B. A., Dasu, T., y Verbsky, J. W. (2014) Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 46(2), 154–168. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8412-4>
- Mamcarz E, Zhou S, Lockey T, Abdelsamed H, Cross SJ, Kang G. (2019) Lentiviral gene therapy combined with low-dose busulfan in infants with SCID-X1. *N Engl J Med* ;380:1525-34.
- Marciano, B. E., y Holland, S. M. (2017). Primary immunodeficiency diseases: Current and emerging therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00937>
- Martín-Mateos, M. A. (2011). Diagnóstico precoz de las inmunodeficiencias. Signos guía y pruebas complementarias orientativas para el pediatra. *Anales de Pediatría Continuada*, 9(3), 145–152. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(11\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(11)70021-X)
- Matus D, Porras O. (2011) Epidemiología de ataxia-telangiectasia en Costa Rica. Costa Rica: San José. Universidad de Costa Rica; V20.

- McCusker, C., Upton, J., y Warrington, R. (2018). Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(s2), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0290-5>
- Modell, V., Orange, J. S., Quinn, J., y Modell, F. (2018). Global report on primary immunodeficiencies: 2018 update from the Jeffrey Modell Centers Network on disease classification, regional trends, treatment modalities, and physician reported outcomes. *Immunologic Research*, 66(3), 367–380. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-8996-5>
- Mohiuddin MS, Abbott JK, Hubbard N, Torgerson TR, Ochs HD, Gelfand EW. (2013) Diagnosis and evaluation of primary panhypogammaglobulinemia: a molecular and genetic challenge. *J Allergy Clin Immunol*;131:1717–8. PubMed PMID: 23726535.
- Morris EC, Fox T, Chakraverty R, Tendeiro R, Snell K, Rivat C. (2017) Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in a severely affected adult. *Blood*; 130:1327-35.
- Leiding, J. W., y Ballow, M. (2018). Precision medicine in the treatment of primary immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 18(2), 159–166. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000431>
- Lim, C. K., Abolhassani, H., Appelberg, S. K., Sundin, M., y Hammarström, L. (2019). IL2RG hypomorphic mutation: Identification of a novel pathogenic mutation in exon 8 and a review of the literature. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0317-y>
- Ochsa, H. D., y Hitzigb, W. H. (2012). History of primary immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(6), 577–587. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32835923a6>
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. (2015) Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number:#308320: Editado 11/06/2015. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

- Padilla, S. E. E., Rosales, F. E., y Argumedo, L. S. (2013). LASID Meeting 2013. *Journal of Clinical Immunology*, 33(S3), 105–139. <https://doi.org/10.1007/s10875-013-9935-9>
- Picard, C., Moshous, D., y Fischer, A. (2015). The Genetic and Molecular Basis of Severe Combined Immunodeficiency. *Current Pediatrics Reports*, 3(1), 22–33. <https://doi.org/10.1007/s40124-014-0070-8>
- Pieper, K., Grimbacher, B., y Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
- Piirilä H., Väliäho J., Vihinen M. (2006) Immunodeficiency mutation databases (IDbases) *Hum. Mutat.* Sep 26;27(12):1200-1208 PubMed as a general reference for the access to content of the IDbases, and quote the IDR home page address, <http://structure.bmc.lu.se/idbase/>.
- Punwani D, Kawahara M, Yu J, Sanford U, Roy S, Patel K. (2017) Lentivirus mediated correction of artemis-deficient severe combined immunodeficiency. *Hum Gene Ther*;28:112-24.
- Raje, N., y Dinakar, C. (2015). Overview of Immunodeficiency Disorders. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35(4), 599–623. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.001>
- Reula, E. S., y De Arriba Méndez, S. (2019). Diagnóstico y manejo de las inmunodeficiencias primarias en niños. *Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos En Pediatría*, 2(December 2019), 415–435. Retrieved from www.aeped.es/protocolos/%0Ahttps://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/28_imunodeficiencias_primarias.pdf
- Richardson, A. M., Moyer, A. M., Hasadsri, L., y Abraham, R. S. (2018). Diagnostic Tools for Inborn Errors of Human Immunity (Primary Immunodeficiencies and Immune Dysregulatory Diseases). *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(19). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11882-018-0770-1> IMMUNE

- Rosen, FS. (2000) A brief history of immunodeficiency disease. *Immunol Rev*: 178:8–12. doi: 10.1034/j.1600-065x.2000.17881.x
- Routes, J., Abinun, M., Al-Herz, W., Bustamante, J., Condino-Neto, A., De La Morena, M. T., Torgerson, T. (2014). ICON: The early diagnosis of congenital immunodeficiencies. *Journal of Clinical Immunology*, 34(4), 398–424. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0003-x>
- Ruggero, P., y Condino-Neto, A. (2012). Primary Immunodeficiency Diseases in Latin America: Epidemiology and Perspectives. *Epidemiology Insights*, (May 2014). <https://doi.org/10.5772/32380>
- Sanger, F. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1097/00006250-199004001-00013>
- Sellner, L. N., y Taylor, G. R. (2004) MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Human Mutation*, 23(5), 413–419. <https://doi.org/10.1002/humu.20035>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., y Ausubel, F. M. (2019) Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>.
- Smith, T., Cunningham-Rundles, C. (2019). Primary B cell immunodeficiency. *Physiology and Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias (LASID). (2021) Estadística, Registros de inmunodeficiencias primarias. Mayo 2021. Tomado de: <https://lasidregistry.org/view/statistics/general/2020-04>
- Shamriz, O. (2019). Update on Advances in Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Immunodeficiency Disorders. *Immunology and Allergy Clinics of NA*, 39(1), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.08.003>
- Shaw KL, Garabedian E, Mishra S, Barman P, Davila A, Carbonaro D. (2017) Clinical efficacy of gene-modified stem cells in adenosine deaminase-deficient immunodeficiency. *J Clin Invest*;127:1689-99.

- Stiehm ER., Johnston R. (2005) A history of pediatric immunology. *Pediatr Res*; 57:458–467. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000151692.05422.4C>
- Stiehm ER., Sullivan K. (2020) *Inborn Errors of immunity*. 2 Ed. Elsevier. p 1332. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-01272-4>
- Stranneheim, H., y Wedell, A. (2016) Exome and genome sequencing: A revolution for the discovery and diagnosis of monogenic disorders. *Journal of Internal Medicine*, 279(1), 3–15. <https://doi.org/10.1111/joim.12399>
- Sriaroon, P., y Ballou, M. (2015) Immunoglobulin Replacement Therapy for Primary Immunodeficiency. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35(4), 713–730. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.006>
- Tangye, S. G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Chatila, T., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Sullivan, K. E. (2020). Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International
- Teimourian, S., Naseeri, S., Pouladi, N., Yeganeh, M. A. A. (2008). Genotype-Phenotype Correlation in Bruton's Tyrosine. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 30(9), 679–683.
- Thermo Fisher Scientific (2020) Next Generatios Sequencing (NGS). Tomado de <https://www.thermofisher.com/cr/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html>
- The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. (2009) *Cómo entender la genética: Una guía para pacientes y profesionales médicos en la región de Nueva York y el Atlántico Medio*. Washington (DC): Genetic Alliance. Anexo G, PRUEBAS GENÉTICAS. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132203/>
- Thrasher, A. J., y Williams, D. A. (2017). Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency. *Molecular Therapy*, 25(5), 1132–1141. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.018>

- Torres-Flores, J. (2011) Ataxia Telangiectasia: Breve descripción clínica. *Revista médica de Costa Rica y centroamérica LXVIII (597)* 163-168
- Tsai, H. Y., Yu, H. H., Chien, Y. H., Chu, K. H., Lau, Y. L., Lee, J. H., Yang, Y. H. (2015). X-linked hyper-IgM syndrome with CD40LG mutation: Two case reports and literature review in Taiwanese patients. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(1), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.07.004>
- VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine. (2020) Christos Kopyanos, Vasilis Tsiolkas, Alexandros Kouris, Charles E. Chapple, Monica Albarca Aguilera, Richard Meyer, and Andreas Massouras. Oxford Bioinformatics, bty897,. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
- Väliäho, Jouni., Smith, Edvard., Vihinen, M. (2006). BTKbase: The Mutation Database for X-Linked Agammaglobulinemia. *Hum Mutation*, 12(September), 1209–1217. <https://doi.org/10.1002/humu>
- Väliäho, J., Faisal, I., Ortutay, C., Smith, C. I. E., y Vihinen, M. (2015). Characterization of All Possible Single-Nucleotide Change Caused Amino Acid Substitutions in the Kinase Domain of Bruton Tyrosine Kinase. *Human Mutation*, 36(6), 638–647. <https://doi.org/10.1002/humu.22791>
- Vignesh, P. y Rawat, A. (2016) An Update on the Use of Immunomodulators in Primary Immunodeficiencies. *Clinical Reviews in Allergy y Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8591-2>
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., y Durtschi, J. D. (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
- Walkovich, K., y Connelly, J. A. (2016) Primary immunodeficiency in the neonate: Early diagnosis and management. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 21(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2015.12.005>
- Wang, L. L., Zhou, W., Zhao, W., Tian, Z. Q., Wang, W. F., Wang, X. F., y Chen, T. X. (2014) Clinical features and genetic analysis of 20 Chinese patients with X-linked

hyper-IgM syndrome. *Journal of Immunology Research*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/683160>

Yazdani, R., Fekrvand, S., Shahkarami, S., Azizi, G., Moazzami, B., Abolhassani, H., y Aghamohammadi, A. (2019) The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management. *Clinical Immunology*, 198, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.11.007>

Yu, J. E., Orange, J. S., y Demirdag, Y. (2018) New primary immunodeficiency diseases: Context and future. *Current Opinion in Pediatrics*, 30(6), 806–820.
<https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000699>

Zhang, H. (2016). Overview of Sequence Data Formats. In *Statistical Genomics* (Vol. 1418, pp. 391–416). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9>